

**Makromolekulák tömegspektrometriája:
A szintetikus oligomerektől a fehérjékig
és a proteomikáig**

MTA Doktori Értekezés

Prókai László

University of North Texas Health Science Center
Fort Worth, Texas, USA

2009

1. Bevezetés

A makromolekulás anyagok az általánosan elfogadott (IUPAC) meghatározás szerint olyan anyagok gyűjtőnevei, amelyek molekuláiban egy vagy többfajta atom, illetve atomcsoport (szerkezeti építőelem) egymáshoz kapcsolódva ismétlődik. E tágabb értelmezés szerint egyaránt idetartoznak a szintetikus és biopolimerek, ezek homológ sorainak kezdeti tagjait képviselő oligomerektől az óriásmolekulákig. Az elmúlt két évtizedben a makromolekulás anyagok tömegspektrometriája jelentősen fejlődésen ment keresztül.

Kétségtelenül, ez a fejlődés két, úgynevezett kéméletes deszorpciós ionizációs módszer (az elektroporlasztásos ionizáció és a mátrixszal elősegített lézerdeszorpciós ionizáció) a múlt század 80-as éveinek végén történt bevezetésére vezethető vissza. A valamivel korábban kifejlesztett deszorpciós ionizációs módszereket (deszorpciós kémiai ionizáció, térdeszorpció, gyorsatom-ionizáció, stb.), illetve az újabb kéméletesebb módszereket már bevezetésükkel egyidejűleg alkalmaztam bizonyos specifikus makromolekulák vizsgálatára [1,2], valamint egy monográfiát is írtam a térdeszorpciós tömegspektrometriáról [3]. A mátrixszal elősegített lézerdeszorpciós ionizáció (MALDI)¹ és az elektroporlasztásos ionizáció (ESI) térnyerésével tudományos érdeklődésem azonban e két újabb és lényegesen eredményesebb módszer alkalmazása felé fordult.

A MALDI és az ESI bevezetése és elterjedése más szempontból is érdekes. A 2002. évi kémiai Nobel-díj [4] egyik kitüntetettje Koichi Tanaka volt, akinek tudományos munkásságát a Nobel-díj bizottság jelentős mértékben a MALDI alapelveinek felismerésében tarthatta úttörő jelentőségűnek, bár e kéméletes deszorpciós ionizációs eljárás biológiai makromolekulák tömegspektrometriás vizsgálatára történő gyakorlati megvalósítása Hillenkamp és Karas nevéhez kötődik [5]. John Fenn-nek, a 2002. évi kémiai Nobel-díj egy másik kitüntetettjének [4], az érdeme az ESI sikeres adaptálása biológiai makromolekulák tömegspektrometriás vizsgálatára [6], hiszen a módszert eredetileg Dole és munkatársai [7] fejlesztették ki és próbálták meg szintetikus makromolekulák vizsgálatára alkalmazni – akkor még

¹ Mivel azok általánosan ismertek, a dolgozatban a legtöbb rövidítést (ESI, MALDI, MS/MS, LC, SEC, GPC, stb.) meghagytam az angol nyelvű szakirodalomban szokásos alakjában.

(1968-ban) sikertelenül. A némiképpen ellentmondásos tudományos elismerések (vagy Hillenkamp és Karas esetében ennek hiánya) ellenére a Nobel-díjak odaítélése utal az alkalmazások alapvető fontosságára. A makromolekulák tömegspektrometriás vizsgálata terén végzett tudományos tevékenységemet alkalmazás centrikus szemléletűnek és interdiszciplinárisnak is tekintem, mivel az alkalmazások több tudományterületre (polimeranalitika, peptidok neurobiokémiája, szupramolekuláris kémia, proteinkémia, gyógyszerkutatás és biológia) terjednek ki. Értekezésemet ezekre az alkalmazásokra összpontosítom.

A polimeranalitikai alkalmazások ismertetésében rávilágítok arra a felismerésemre, amely lehetővé tette bonyolult összetételű szintetikus oligomerkeverékek ESI tömegspektrometriás vizsgálatát, kiküszöbölve a módszer már korábban felismert fogyatékosait. Ezt követően tárgyalom az ESI neuropeptidok vizsgálatára történő alkalmazását, különös tekintettel arra, hogy hogyan lehet megismerni a neuropeptidok szövetekben lejátszódó metabolizmusát. Ez utóbbi kutatási területen tevékenységem legfontosabb eredményének az alkalmazott *in vitro* és *in vivo* modellek a célnak legmegfelelőbb kiválasztása tekinthető. A dolgozatban röviden ismertetem továbbá a makromolekulákhoz köthető nem kovalens kölcsönhatások tömegspektrometriás vizsgálatával kapcsolatos eredményeimet.

Izolált specifikus fehérjék ESI, MALDI és folyadék-kromatográfiával (LC) kombinált tandem tömegspektrometria (MS/MS) segítségével történő azonosításának, illetve *de novo* szekvenálásának ismertetését követően a proteomikában elért eredményeimet foglalom össze. Ez utóbbi témakörben a dolgozatban ismertetem az emlős központi idegrendszer egyes sejtalkotó komponenseinek (szinaptikus plazmamembrán és endoplazmatikus retikulum) fehérjeösszetételének meghatározását érintő munkáimat. A kvantitatív neuroproteomika módszereivel eredményesen tanulmányoztam továbbá bizonyos gyógyszereknek a központi idegrendszer fehérjeire gyakorolt hatását, amelyek közül a dolgozatban a morfinnak a szinaptikus plazmamembránra történő hatását tárgyalom részletesebben. Fontosnak tartom végezni egy poszt-transzlációs módosulás (fehérjéknek a lipid-peroxidáció egyik végtermékével történő kovalens adduktképzése) tömegspektrometrián alapuló módszerek segítségével történő átfogó vizsgálatát, illetve a kutatások során kapott eredményeket.

2. Irodalmi áttekintés

A makromolekulás anyagok tömegspektrometriájának szakirodalma ma már rendkívül szerteágazó, ezért nem törekedtem a módszer minden lehetséges felhasználási területének áttekintésére. A vonatkozó közlemények részletes áttekintését nem tartom szükségesnek az alkalmazást előtérbe helyező témakörönkénti tagolás nélkül. Az alábbi, alfejezetekre bontott irodalmi áttekintés alapvetően a dolgozatomban ismertetett kutatások háttérét hivatott vázolni, elsősorban az általános gyakorlatra és nem egyedi alkalmazásokra összpontosítva. A sorrend megválasztásánál elsősorban a makromolekulákat felépítő monomerek sokféleségét (diverzitását), másodsorban a molekulatömeget, végül pedig a vizsgált rendszer összetettségét alkalmaztam vezérlő elvként. Ennek megfelelően először a szintetikus oligomerek tömegspektrometriáját foglaltam össze, majd áttekintést adtam a neuropeptidek és a ciklodextrin-komplexek tömegspektrometriájának szakirodalmi háttéréről. A fehérje szekvencia meghatározását érintő alfejezetet követően végül rövid összegzést adtam a proteomika módszereiről, különös tekintettel a neuroproteomika gyakorlatára.

2.1. Szintetikus oligomerek tömegspektrometriája atmoszférikus nyomáson történő ionizáció alkalmazásával

Az ESI tömegspektrometriát elsőként a biopolimerek, elsősorban peptidek és fehérjék, molekulatömegének meghatározására alkalmazták [8]. Ezeknél a makromolekuláknál az ionizáció túlnyomórészt többszörös protonálódással történik, amelynek eredményeként $[M+nH]^{n+}$ ionokat találunk a tömegspektrumban. Felismerték azonban, hogy az ESI alkalmazható szintetikus polimerek tömegspektrometriás elemzésére, és hogy az ionizáció általában többszörös kationadduktokat eredményez [9].

Az atmoszférikus nyomású ionizáció (API)² polimeranalitikai felhasználásának jelenleg is érvényes gyakorlatát (tárgyalva az ionizáció mechanizmusát, az alkalmazott készülékeket, kísérleti körülményeket, a kapott tömegspektrumok

² Az ESI-n és annak például az ultrahanggal segített vagy „nano” változatain kívül az atmoszférikus nyomáson történő kémiai ionizációt és fotoionizációt is e módszerek közé szokás sorolni.

interpretálását, és az LC–MS módszereket) egy összefoglaló közleményben [10], majd egy könyvfejezetben már részletesen tárgyaltam és számos példával szemléltettem [11]. A szintetikus polimerek tömegspektrometriával történő közvetlen vizsgálatának számos előnye van. A módszer lényegesen gyorsabb és jóval részletesebb molekulatömegre illetve molekulatömeg-eloszlásra vonatkozó információt szolgáltat, mint az általában erre a célra alkalmazott kromatográfiás módszerek. Az ESI polimeranalitikai alkalmazásának vannak azonban bizonyos hátrányai is; például a többszörös töltésű ionok képződése következtében a szintetikus polimerek ESI tömegspektruma sok esetben rendkívül bonyolult. A különböző polimerizációs fokú és eltérő töltésű speciesek átfedése igen jelentős lehet még egyszerű homopolimerek esetén is [9], ezért e mérések szakértő interpretálást vagy megbízható számítógépes dekonvolúciót igényelnek [12]. Sok esetben extrém nagy tömegfelbontás is szükséges [13], amely lehetőség azonban csak a legtöbb polimeranalitikai laboratórium számára elérhetetlen csúcskészülékek esetében biztosított.

A többszörös töltésű ionok képződése nem jellemző a MALDI módszerre, ezért érthető volt, hogy kezdetben a szintetikus polimerek tömegspektrometriás elemzésére az ESI helyett inkább a MALDI-t alkalmazták [14]. Az átlagos molekulatömegek, molekulatömeg- és kémiai összetétel-eloszlások pontos meghatározásához azonban a tömegspektrometriás módszernek számos követelményt kell teljesíteni. Számtalan tényező – a mintaelőkészítés, a tömegtől függő deszorpciós és ionizációs effektusok és egyedi műszersajátságok – következtében a széles molekulatömeg-eloszlású szintetikus polimerek tömegspektrometriás elemzésének számos korlátja van, ami elsősorban, de nem kizárólagosan, a mennyiségi meghatározásokat kapcsán okozhat problémákat [15]. Ezek a korlátok minden ionizációs vagy deszorpciós módszerre érvényesek, beleértve az MALDI-t is [15]. Ezért az átlagos molekulatömegek, molekulatömeg- és kémiai összetétel-eloszlások pontos meghatározásában a széles molekulatömeg-eloszlású szintetikus polimerek esetében a méretkizárásos kromatográfiát (SEC, differenciális törésmutató index, fényszóródásos vagy viszkozimetriás detektálással) [16] megbízhatóbbnak tekintik, mint a közvetlen tömegspektrometriás méréseket [11, 15]. A SEC-vel történő meghatározások pontossága függ azonban az alkalmazott kalibrációs módszertől, mivel a kromatográfiás elválasztás még ideális esetben sem a molekulatömeg, hanem

hidrodinamikus térfogat szerinti méretkizárás alapján történik [16]. A SEC kalibráció a gyakorlatban többnyire a relatív molekulatömeg (M_r) és a hidrodinamikus térfogattal arányosnak tekintett elúciós térfogat (V_E) közötti összefüggést hivatott meghatározni, különös tekintettel a csak differenciális törésmutató index (RI) detektorral rendelkező műszereknél. A kalibrációhoz leggyakrabban különböző átlagos molekulatömegű, kis polidiszperzitású polisztirolt vagy poliakrilátokat/metakrilátokat alkalmaznak. Ezek a kalibrációk azonban többnyire csak közelítőleg érvényesek és (például) a „polisztirol-ekvivalens” molekulatömegek lényegesen eltérhetnek a tényleges értékektől [11, 15]. A viszkozimetriás detektáláson alapuló „univerzális” kalibráció ugyan egy lehetséges megoldás [17], újabb tanulmányok azonban már felhívták a figyelmet arra, hogy még ebben az esetben is indokolt a vizsgált polimerek tulajdonságait figyelembe vevő paraméterek bevezetése [18], és különböző detektálási módszerek együttes alkalmazása [19]. A kromatográfiás polimeranalitikai módszereknél általánosan alkalmazott detektálási módszerek továbbá nem, vagy csak korlátozottan alkalmasak szerkezeti és összetételi információk közvetlen meghatározására [11, 15]. Erre viszont kiválóan felhasználható a tömegspektrometria, különösen analitikai elválasztással kombinálva [11].

2.2. A neuropeptidek tömegspektrometriája

A neuropeptidek fontos funkciót töltenek be a központi idegrendszerben (neurotranszmitterek, neuromodulátorok és neurohormonok), valamint számos fiziológiás vagy patofiziológiás folyamatban (például fájdalom, memória, reprodukció, táplálkozás, stb.) van kulcsfontosságú szerepük [20]. E makromolekulák elemzésében a deszorpciós tömegspektrometria előnyeit már korán felismerték [21, 22]. Ugyan a módszer a peptidszintézisek analitikai támogatásában már hosszú ideje fontos szerepet tölt be [23–26], használata a neuropeptidek biológiai közegben történő vizsgálatában azonban az ESI és a MALDI elterjedéséhez köthető, mivel e két ionizációs technika a rutinvizsgálatokhoz is megfelelő érzékenységet biztosított [27, 28]. Tömegspektrometria bevezetése az emlősök központi idegrendszerében jelenlévő neuropeptidek elemzésében hozott jelentős fejlődést [29, 30]. E tanulmányokat általában kísérleti állatokban végezték, ezért a szakirodalmi áttekintést az erre a területre vonatkozó alkalmazásokra összpontosítottam.

A neuropeptidek igen kis koncentrációban vannak jelen a központi idegrendszerben és biológiai közegben általában meglehetősen bomlékonyak [31]. Az elhalt szövetben bekövetkező (*post mortem*) fehérjebomlás viszont olyan nagymértékű, hogy ez a neuropeptidek elemzését „háttérként” zavaró peptidek megjelenésével jár [32]. E tényezőket tanácsos figyelembe venni a mintavétel és mintaelőkészítés megválasztásánál. Az endogén neuropeptidek tömegspektrometriás vizsgálatában napjainkban a *post mortem* fehérjebomlásból eredő peptidek mennyiségének visszaszorítását alapvető fontosságúnak tekintik. A folyamatot katalizáló enzimek inaktiválására egerek és patkányok esetében sikeresen alkalmazták a fókuszált mikrohullámú besugárzást [33]. Az ehhez szükséges speciális és költséges készülékek azonban nem állnak minden laboratórium rendelkezésére, ezért alkalmaztak egyszerű (konyhai) mikrohullámú berendezést is [34]. Alternatív megoldás az enzimkatalizált *post mortem* bomlást értelemszerűen kiküszöbölő *in vivo* mikrodialízis alkalmazása is [35]. Ez a módszer egy félig áteresztő polimer-membránnal ellátott, a kísérleti állat meghatározott agyterületébe implantált kisméretű próba alkalmazásán alapul. Az *in vivo* próba kis térfogatárammal történő perfúziójával elérhető, hogy a központi idegrendszerben (pontosabban annak intersticiális folyadékközegében) jelenlévő vegyületek az efflux-folyadékba (mikrodializátumba) kerüljenek. A perfúziót általában egy, az intersticiális folyadékot elektrolit-összetételében utánzó úgynevezett mesterséges cerebrospinális folyadékkal (CSF) végzik. A félig áteresztő polimer membrán pórusméretének megfelelő megválasztásával biztosítható, hogy a neuropeptidek bomlásáért felelős enzimek (fehérjék, $M_r > 5000$ Da) ne kerüljenek be a gyűjtött mikrodializátumokba. Az *in vivo* mikrodialízist előszeretettel alkalmazzák klasszikus neurotranszmitterek (acetilkolin, katekolaminok, glutaminsav, stb.) mérésére [36] és a gyógyszerkutatásban [37], valamint klinikai alkalmazása is kezd elterjedni [38]. A módszer előnyös tulajdonságait neuropeptidek vizsgálatában is megmutatták [39–41].

A neuropeptidek metabolizmusa neurotranszmitter és neuromodulátor funkciójukkal kapcsolatos jelenség [42]. Ez azzal hozható összefüggésbe, hogy az idegsejtek a neuropeptideket kiválasztásuk után nem reabszorbeálják, hanem azok az extracelluláris térben enzimek (endo- és exopeptidázok) közreműködésével hidrolizálnak. E metabolizmus szerepe nemcsak a hatástalanítás, hanem sok esetben a biológiai aktivitásprofil irányított megváltoztatása is; így a folyamat maga is fontos

neurobiológiai funkcióval rendelkeznek. A neuropeptid lebontás alapos megismerése ezért egy fontos kutatási terület. A metabolizmus (katabolizmus) felderítésének hagyományos módja a vizsgált neuropeptid, mint szubsztrátum, inkubálása egy alkalmas neurobiológiai közegben (*in vitro*): szövetmetszetben vagy szövethomogenizátumban, szubcelluláris szövetfrakciókban, és tenyésztett sejtekben (idegsejtek, gliasejtek, endotélsejtek, stb.) [43]. A folyadékkromatográfiás vagy kapilláris elektroforézissel történő elválasztást és a várható lebomlási termékek azonosítását szintetikus peptidek segítségével végző módszer mellett [43, 44] egyre nagyobb teret nyertek a tömegspektrometriát (is) alkalmazó *in vitro* vizsgálatok [45–48]. Felismerték továbbá azt is, hogy a neuropeptidek metabolizmusa tanulmányozható *in vivo* mikrodialízis alkalmazásával is [49]. A módszer kihasználja, hogy a perfúziós közegben feloldott neuropeptid bejut a szövetbe (az utóbbi folyamat szokásos megnevezése „retrodialízis” [41]), és hogy a retrodialízissel egyidejűleg gyűjtött mikrodializátumokban kimutathatók a bejuttatott neuropeptid agyban lejátszódott metabolizmusának termékei is.

Szerencsére a neuropeptideket tartalmazó biológiai eredetű minták vizsgálata általában nem igényel a MALDI, ESI, LC–MS vagy MS/MS általános gyakorlatához képest speciális tömegspektrometriás technikákat és körülményeket [27]. A megfelelő műszerek és módszerek kiválasztásában értelemszerűen meghatározó szerepe van annak, hogy milyen a minta összetétele (komplexitás) és koncentrációja (szükséges kimutatási határ és dinamikus méréstartomány) [28].

2.3. A ciklodextrin-komplexek elektroporlasztásos tömegspektrometriája

A természetes ciklodextrinek hat (α -CD), hét (β -CD) vagy nyolc (γ -CD) α -D-glükopiranoz egységekből álló gyűrűs oligoszaharidok (léteznek továbbá ezektől eltérő gyűrűtagszámú – kisebb jelentőségű – ciklodextrinek is) [50]. A szakirodalom szerint számos kémiai módosított ciklodextrint is előállítottak már [51, 52]. A ciklodextrinek hidrofób belső üreggel és hidrofil külső felülettel rendelkező makromolekulák: ennek következtében asszociációs típusú molekulakomplexeket (host–guest vagy zárványkomplexeket) képeznek különböző, egy vagy több hidrofób csoportot tartalmazó molekulákkal [52]. A ciklodextrin-komplexek gyógyszertechnológiai jelentősége [50–53] ösztönözte különféle analitikai módszerekkel, többek között a tömegspektrometriával történő vizsgálatukat is.

A ciklodextrin-komplexek gyorsatom-ionizációs (FAB) [54], majd ESI [55] tömegspektrometriás elemzésének lehetőségét és előnyeit már röviddel a módszerek bevezetése után felismerték. Ezeket a molekulakomplexeket később is előszeretettel alkalmazták mint modelleket a nemkovalens interakciók gázfázisban történő tanulmányozására [56, 57]. Míg a ciklodextrin-komplexek általában nem esnek szét a FAB és az ESI által biztosított kíméletes deszorpciós ionizáció során, a MALDI alkalmazásával kapott eredmények viszont nem egyértelműek ebben a tekintetben [58, 59]. A FAB visszaszorulásával egyértelműen az ESI-t tekinthetjük a leggyakrabban alkalmazott módszernek a molekulakomplexek tömegspektrometriás vizsgálatában.

A ciklodextrin-komplexek egyszerű detektálásán túlmutató alkalmazásokat illetően számos érdekes kérdés merül fel, elsősorban arra vonatkozóan, hogy vajon vizsgálható-e tömegspektrometriával a host–guest kölcsönhatás erőssége? Két kísérleti megközelítés alakult ki ebből a szempontból [57]. Az egyik a tömegspektrometriás detektálást felhasználó „folyadékfázisú” módszer, amelynek kompetíciós [60] és titrálós [61] változatait használták fel ciklodextrin zárványvegyületek vizsgálatára [62–64]. A másik „gázfázisú” komplexek stabilitását vizsgálja különböző tömegspektrometriás disszociációs módszerekkel [57], amelyek közül az ütköztetéssel aktivált disszociációt (CID) [62, 65, 66] és gázfázisú hődisszociációt (HCD) [67, 68] alkalmazták ciklodextrin-komplexek tanulmányozására. A host–guest kölcsönhatás erőssége szempontjából eltérés mutatkozhat a „folyadékfázisú” és a „gázfázisú” kísérletek eredményei között, mivel az utóbbiak esetén az árnyékoló oldószer molekulák eltávolításával az elektrosztatikus és a dipoláris kölcsönhatások erősödnek, a hidrofób kölcsönhatások pedig gyengülnek [57]. Ha a komplexképződés tendenciáját vizsgáljuk, az eddig vizsgált különféle ciklodextrinek és a velük zárványvegyületet alkotó molekulák kötéserősségére azonban a fent említett kutatások nem tudtak lényeges különbségeket kimutatni a két módszer között.

2.4. Izolált fehérjék tömegspektrometriás azonosítása és *de novo* szekvenálása

A MALDI, ESI, LC–MS és MS/MS elterjedésével, valamint a fehérje-adatbázisok bővülésével a biológiai/biokémiai módszerekkel izolált fehérjék azonosítása egyre könnyebbé vált. A fehérjét (a diszulfidhidak redukálása és

alkilezése után) proteolitikus enzimmel (leggyakrabban tripszinnel) emésztjük, és a kapott peptidkeverék tömegspektrometriás elemzésével kapott adatokat megfelelő keresőprogrammal megpróbáljuk az adatbázisban található, valamely ismert szekvenciájú fehérjéhez rendelni. A munka e rövid és általános leírása valójában igen leegyszerűsítő. Az alkalmazott ionizációs technika és a rendelkezésre álló tömegspektrométerek típusa nagyban befolyásolja nemcsak az eljárás teljesítőképességét és megbízhatóságát, hanem az alkalmazható keresőstratégiákat is. A legegyszerűbb a „peptid-ujjlenyomat” (peptide-mass fingerprint, PMF) módszer [69–72], amely azon alapul, hogy egy fehérjéből proteolitikus emésztéssel keletkezett peptidek tömegei egyedi kombinációt alkotnak. Egy fehérjét ezért annak proteolitikus fragmenseinek tömege ismeretében elvileg azonosíthatunk egy olyan adatbázisból, amelyet úgy állítottunk össze, hogy az összes ismert vagy a génszekvencia alapján feltételezett fehérjéhez azok aminosav-szekvenciája alapján „elméleti” (más néven számítógépes vagy *in silico*) emésztéssel hozzárendeltük a lehetséges proteolitikus peptideket, pontosabban azok molekulatömegeit. Egy megfelelő adatbázisból egy adott fehérje általában egyértelműen azonosítható már négy-öt proteolitikus peptid tömegének ismeretében is, ha ezek együttesen képviselik a fehérje szekvenciájának legalább 15%-át [73, 74]. Érthető, hogy ezt a stratégiát a MALDI-repülésidő (TOF) tömegspektrometriával kombinálva célszerű alkalmazni, mivel ez esetben a felvett tömegspektrumokban – ellentétben az ESI módszerrel, amely szakértő interpretálást vagy számítógépes „dekonvolúciót” igényel [11, 75] – az egyszerűen protonált peptidek ionjai dominálnak és a proteolitikus emésztés termékeiről így közvetlen és ugyanakkor egyértelmű információt kaphatunk. Az igen kis mintaigény, a TOF megbízhatósága, széles tömegtartománya és tömegmérési pontossága (a napjainkban használt készülékeken megfelelő kalibrációt követően általában <20 ppm) ugyancsak segítette a módszer széleskörű elterjedését. Azonban sok fehérje szekvencia-lefedettsége tripszines emésztés és MALDI alkalmazása esetén a fellépő „ionlenyomás-effektusok” következtében meglehetősen korlátozott [76].

A fehérjékből proteolitikus emésztéssel képződő peptidek ionizációs sajátosságait vizsgálva elmondhatjuk, hogy a MALDI-t az ESI módszer általában nagyon hasznosan kiegészíti [77, 78], az ESI μ - vagy nano-LC-vel való online kombinációja pedig többnyire nagyobb szekvencia-lefedettséget eredményez a közvetlen MALDI elemzésekhez képest [79]. Az LC-ESI-MS/MS elterjedésével már a

peptidszekvencia-információk is hozzáférhetők [80], amelyek nagymértékben növeli a fehérjék azonosításának megbízhatóságát és lehetővé teszi a fehérjeszekvenciák teljes, fehérje-adatbázisra vagy a génszekvencia ismeretére alapozott analízisét [81].

Egy organizmus még ismeretlen génszekvenciájának meghatározása bonyolult és egyelőre meglehetősen hosszú eljárás [82]. Ma már a közvetlen tömegspektrometriás módszerekkel még abban az esetben is lehetséges egyedileg izolált proteinek szekvenciájának meghatározása, ha a génszekvencia nem ismert. Természetesen, ez az úgynevezett *de novo* szekvenálási módszer kíméletes ionizáció és MS/MS alkalmazásán alapul. A módszer általában a fehérjék proteolitikus lebontását igényli („bottom-up” megközelítés) [83], de az ezt elkerülő „top-down” szekvencia meghatározás lehetőségét is felvetették már [84]. Az első sikeres *de novo* tömegspektrometriás fehérjeszekvenálást, a proteolitikus emésztés termékeinek félpreatatív RPLC segítségével történt izolálását követően, még FAB-CID-MS/MS alkalmazásával és a tömegspektrumok kézi értékelésével végezték [85]. A MALDI és az ESI megjelenésével, valamint alternatív iondisszociáció, mint például az elektronbefogásos disszociáció (ECD) [86], bevezetésével a módszer hatékonysága egyértelműen megnövekedett. Ezek a technikák a fehérje poszttranszlációs módosításainak (PTM) hatékony meghatározását is lehetővé tették [87]. A nagyfelbontású műszerek (az ionreflexiós TOF, a Fourier-transzformációs ionciklotron rezonancia, FTICR, vagy az ugyancsak Fourier-transzformációt alkalmazó Orbitrap analízátor) és a különféle „hibrid” készülékek (kvadrupólus-TOF, ioncsapda-FTICR, stb.) megjelenése és elérhetővé válása is nagymértékben hozzájárult ahhoz, hogy a *de novo* tömegspektrometriás fehérjeszekvenálást ma már nemcsak néhány laboratórium képes elvégezni [88, 89]. A feladat megoldása azonban még mindig nagy kihívást jelent, bár különféle számítógépes programokat már kifejlesztettek a kiértékelések megkönnyítésére [90].

2.5. A tömegspektrometrián alapuló proteomika, különös tekintettel a neuroproteomikára

A proteomika egy viszonylag új, interdiszciplináris tudományterület, amely az organizmusok génjei („genom”) által kódolt fehérjék („proteom” [91]) átfogó vizsgálatával foglalkozik, beleértve az expressziós profilok meghatározását, a génszekvencia által nem kódolt (azaz a genomika számára elérhetetlen)

poszttranszlációs módosítások és fehérje-kölcsönhatások felderítését, valamint az ezekre vonatkozó mennyiségi fehérje- vagy PTM-meghatározásokat [92]. A proteomika ma már rendkívül szerteágazó: az egyik vezető folyóirat, a WILEY-VCH Verlag (Weinheim, Németország) által kiadott *Proteomics*, a közleményeket csoportosítva számos szekcióban jelenteti meg (technológia, sejtbiológia, mikrobiológia, növény és állat proteomika, bioinformatika, stb.), és 2007-ben a klinikai alkalmazások közzlésére már egy külön folyóiratot is indított (*Proteomics – Clinical Applications*). A tömegspektrometria a proteomika vizsgálati módszereinek többségében a legalapvetőbb eszköz [93, 94]. A vonatkozó kutatások többnyire peptidek elemzésén alapulnak („bottom-up” stratégia), a technikai megközelítést illetően sok a hasonlóság a 2.4 alfejezetben leírtakkal. A proteomika gyakorlata azonban lényegesen összetettebb az alkalmazott módszerek és módszerkombinációk tekintetében, mivel egy izolált fehérje helyett gyakran igen bonyolult elegyekkel foglalkozik (mind az alkotó fehérjekomponensek számát, mind a komponensek dinamikus koncentrációtartományát figyelembe véve), továbbá a kutatók gyakran tűzik ki célként a fehérjék (vagy specifikus PTM-ek) mennyiségi meghatározását is [95]. A bioinformatika ezért rendkívül fontos rokon tudományterület, amelynek fontos szerepe van a kísérletekből kapott nagy mennyiségű adatok feldolgozásában és az eredmények biológiai vonatkozásainak felderítésében és interpretálásában [96].

Prototipikus egysejtű eukarióták fehérjeinek és a közöttük kialakuló bonyolult interakcióknak feltérképezésére már találhatók a szakirodalomban a proteomika segítségével végzett átfogó vizsgálatok [97], a magasabbrendű szervezetekre azonban hasonló megközelítés egyelőre még nem lehetséges. Sok fehérje-összetevő meghatározása viszont sikeresen elvégezhető szervekre, sejttípusokra vagy sejtalkotókra. Ennek megfelelően a proteomikának számos szakterülete (vaszkuláris proteomika, neuroproteomika, membrán proteomika, mitokondriumok proteomikája, stb.) alakult ki – sokszor a klinikai kutatásokhoz és gyógyászati alkalmazásokhoz kapcsolódva (rákbetegségek proteomikája, a testfolyadékok proteomikája, stb., elsősorban az úgynevezett „biomarkerek” felderítésére).

Az emlősök központi idegrendszerének anatómiai, celluláris és biokémiai összetettsége következtében a proteomikának az agykutatásban történő alkalmazása még csak kezdeti szakaszában van [98, 99]. A szövetek közvetlen elemzése legtöbb esetben csak korlátozott mélységig enged betekintést az agy fehérje-összetevőibe,

különösen olyan hagyományos módszerek esetén, mint a kétdimenziós poliakrilamid-gél elektroforézisre (2D-PAGE) alapozott proteomika [100]. Ez utóbbi csak a kellően gyakori fehérjéket teszi hozzáférhetővé a vizsgálatok számára, és gyakorlatilag kizárja a legtöbb hidrofób membránfehérjét az izoelektromos fókuszolás (IEF) mint az első elektroforetikus dimenzió alkalmazásának következményeként [101]. Az agy teljes proteomját átfogó vizsgálatok helyett sokszor célravezetőbb, alkalmas szubcelluláris frakcionálás felhasználásával, meghatározott „szubproteomra” (például a szinaptikus membránban, vezikulákban, neuromitokondriumokban, stb., jelenlévő fehérjékre) összpontosítani [102–104]. A fontos celluláris szabályozófolyamatok (foszforiláció, glikozilálás, stb.) [102, 105] vagy molekuláris stressz jelenségek hatásának felderítésére irányuló tanulmányoknak a szubcelluláris szintre irányuló PTM teremti meg az alapokat. A stressz jelenségek tekintetében a legismertebb az oxidatív stressz [106], amelynek egy univerzális jelzője az irreverzibilis fehérjekárosodást okozó karboniláció [107]. A karbonilált fehérjék eltávolítása alapvető fontosságú a sejtek számára, mert ezek inaktív, gyakran mérgező „hulladékot” képeznek és a sejtek funkcióit gátolják [108]. Karbonilszármazékok felhalmozódása a sejtekben számos patofiziológias állapottal (rheumatoid arthritis, Alzheimer-kór, stb.) és az öregedéssel hozták kapcsolatba [107]. A fiziológiailag inaktív fehérjék sejtekben történő felszaporodása ellen a szervezet lebontó folyamatokkal ugyan védekezik, kimutattak azonban olyan nagy aggregátumokat, amelyek a proteaszómákban történő lebontásnak ellenállnak [108].

Az oxidatív stressz nemcsak a proteomra van hatással; a többszörösen telítetlen zsírsavak szabadgyökös peroxidációjából származó telítetlen aldehidek utalnak jelenlétére a „lipidom”-ban (egy szervezet által bioszintetizált lipidek összessége) is [109]. Az egyik legismertebb lipid-peroxidációs végtermék (a 4-hidroxi-2-nonenal, HNE [110]) viszont reagálhat a fehérjék nukleofil funkciós csoportjaival, és az így keletkező specifikus PTM hozzájárulhat – a HNE-addíció fehérjefunkciót módosító hatása következtében – több patológias folyamathoz (ateroszklerózis, cukorbetegség, neurodegeneratív betegségek, stb.), illetve köze lehet az öregedéshez, így HNE-módosulás proteomika segítségével történő tanulmányozása igen nagy jelentőségű [111]. A neuroproteomika terén végzett vizsgálatok [112, 113] azonban még nem használták ki eléggé a korszerű tömegspektrometria (különösen az LC–ESI-MS/MS) által biztosított szelektivitást és specifitást [114]. Ez a megállapítás érvényes

fehérjék és egyéb lipid-peroxidációs termékek (malondialdehid, akrolein, stb.) adduktjainak meghatározására irányuló kutatásokra is [106].

A hagyományos 2D-PAGE hátrányainak (nem alkalmas hidrofób, extrém izoelektromos ponttal rendelkező, valamint ritkább fehérjékre [101]) kiküszöbölésére alkalmazzák az egydimenziós nátrium dodecilszulfát (SDS-) PAGE módszert, amely kétdimenziós (2D) eljárásá tehető a gélben történő fehérje-emésztést követő RPLC-ESI-MS/MS alkalmazásával [115]. Ez a „GeLC-MS/MS”-nek is nevezett módszer eredményesen használható a neuroproteomikában is [41, 116]. Egy, a már proteolitikusan (általában tripszinnel) emésztett fehérjeminta erős kationcserés kromatográfiás (SCX) frakcionálását is gyakran alkalmazzák az elválasztás első lépéseként, amelyet RPLC-ESI-MS/MS követ, mint második „dimenzió” [117]. Bevezették továbbá a „kétfázisú” (SCX+RP) tölteten alapuló nano-LC-ESI-MS/MS módszert, amely egy igen hatékony multidimenziós fehérjeazonosítási technológiát (MudPIT) biztosít [118].

A gyakorlati proteomikában a fehérjék azonosításán kívül azok mennyiségi meghatározása is fontos. A 2D-PAGE segítségével elválasztott fehérjék mennyisége közelítőleg meghatározható az azokat képviselő „foltoknak” (spots) a gélen történő megfestésével [101]. Ezt a módszert általában összehasonlító vizsgálatokban használják (például egészséges és kóros szövetek, kezeletlen és kezelt egyedekből származó minta, stb., összehasonlítására), amelyekben a foltok megfestésének intenzitását veszi figyelembe, mint az elválasztott fehérje mennyiségére utaló mértéket. Az LC-MS/MS elterjedésével a proteomikában is egyre népszerűbbek a stabilizotópok (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O) segítségével történő mennyiségi meghatározások [119]. Ennek gyakorlati megvalósítására a metabolikus jelölés [120, 121], a fehérjék nehézvízes (H_2^{18}O) közegben végzett proteolitikus emésztése [122] és a jelzett reagensek felhasználása [123, 124] a leggyakoribb módszerek, amelyeknek egyre nagyobb a jövője a neuroproteomikában is [41, 99].

3. Kísérleti módszerek

Az értekezésben összefoglalt kutatások többféle tömegspektrométer felhasználásával történtek. A polimeranalitikai módszerek létrehozásához és kipróbálásához kezdetben egy kvadrupólusos (Vestec ES2000) [125, 126], majd egy FTICR (Finnigan Newstar) [127, 128] és egy kvadrupólusos (ún. „3D”) ioncsapdás analizátorral (Thermo-Finnigan LCQ) [128, 129] ellátott készülékek álltak a rendelkezésemre – saját laboratóriumomban, illetve tudományos együttműködés keretében. Az ionizációhoz többnyire ESI-t használtunk [125–128], de az ioncsapdás készüléken alkalmaztunk APCI-t is [129].

A neuropeptidekkel kapcsolatos kutatások kizárólag ESI alkalmazására épültek, és az említett tömegspektrométereken kívül [130–133] történtek vizsgálatok háromlépcsős kvadrupólusos analizátorral rendelkező műszerrel (Micromass-VG Trio-3) is [41, 130].

A ciklodextrin-komplexek ESI tömegspektrometriás vizsgálatához főként a kvadrupólusos készüléket használtuk [134]. Nagyfelbontású felvételek készítéséhez FTICR-t (Brucker Apex II) [135] készüléket alkalmaztunk.

Fehérjeazonosításhoz szükséges MALDI-TOF méréseket egy ABI Voyager DE-Pro készüléken [136–139], MALDI-MS/MS kísérleteket egy ABI QSTAR kvadrupólus – TOF hibrid tömegspektrométeren végeztünk [139]. Az LC-ESI-MS/MS módszert először a 3D-ioncsapdás tömegspektrométerünkön (LCQ) alkalmaztuk fehérjeazonosításra [136] és a neuroproteomikában végzett kutatásokra [137, 140], de újabb vizsgálatainkhoz [141–145] már egy lineáris ioncsapda – FTICR (Thermo-Finnigan LTQ-FT) hibrid készülék állt rendelkezésünkre. Ez utóbbi segítségével végeztünk *de novo* fehérjeszekvenálást [146], amelyhez az MS/MS kísérletekben a CID mellett már ECD-t is alkalmaztunk. A neuroproteomikához kulcsfontosságú adatbázisokat (National Center for Biotechnology Information, NCBI, SwissPROT és International Protein Index, IPI), kereső (MS-Fit, Mascot és SEQUEST), adatkezelő (Scaffold), peptidszekvenálást támogató (DeNovoX) és bioinformatika programokat (BiNGO és Ingenuity Pathway Analysis) a lehetőség szerint a világhálón keresztül ingyenesen használtuk vagy letöltöttük, illetve megvásároltuk.



Az online SEC–, vagy gyakori alternatív elnevezés szerint a gélpermeációs kromatográfia (GPC), és az RPLC–MS kombinációkban alkalmazott, valamint az off-line SCX frakcionáláshoz használt folyadékkromatográfokat is több műszergyártótól szereztük be (ABI-Kratos, Agilent-HP, Isco, Thermo-Finnigan, Eldex és Eksigent). A tömegspektrometriával kombinált analitikai elválasztásokat – természetesen az adott feladathoz megfelelő kromatográfiás oszlop(ok) kiválasztását és beszerzését, továbbá körültekintő módszerfejlesztést vagy adaptálást követően – a szokásos laboratóriumi gyakorlatnak megfelelően végeztük.

A disszertációban bemutatott kísérletekhez felhasznált segédeszközök és anyagok jelentős része a kereskedelmi forgalomban beszerezhető volt. A vinil végcsoportú glicidilmetakrilát-butilmetakrilát (GMA/BMA) kopolimert a Du Pont Marshall R&D Laboratory-ban (Philadelphia, USA) állították elő 2,2-azo-bisz(izobutironitril) (Vazo) által iniciált és Co(dimetilglioxim-BF₂)₂ láncátvivőt alkalmazó oligomerizációval [147]. A különböző citolizinek [136] és a *Thiocapsa roseopersicina* citokróm c₄ fehérje [146] vizsgálatát tudományos együttműködés keretében végeztük, elkülönítésüket és tisztításukat tömegspektrometriás kutatásainkat megelőzően [148] vagy azzal csaknem egyidőben közzölték [149]. Néhány peptidet a Peptide 2.0, Inc. (Chantilly, Virginia állam, USA), szintetizált, amelyekből a HNE-addíciós PTM-vizsgálatok módszereinek fejlesztéséhez és azok kipróbálásához használható módosított molekulákat laboratóriumom állította elő [145]. Az üvegszemcsékhez kémiaiilag kötött hidrazid-reagenst Roe és munkatársai közleménye [150] alapján készítettük el.

A szövetekkel kapcsolatos *in vitro* tanulmányokat és az *in vivo* vizsgálatokat is saját laboratóriumom végezte, kivéve az endoplazmatikus retikulum frakció egerek agyából történő izolálását [143] és a mitokondriumok fiatal és idős patkányok agyából való elkülönítését [139], amely részfeladatokat szintén tudományos együttműködőim oldották meg. Az állatkísérleteket a University of Florida (Gainesville, USA) és a University of North Texas Health Science Center (UNTHSC, Fort Worth, USA) megfelelő bizottságai (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) engedélyezték, és természetesen figyelembe vették az USA Országos Tudományos Tanácsának (NRC) Laboratóriumi Állatkísérletek Intézete (ILAR) által meghatározott irányelveket.

4. Jelentős eredményeim összefoglalása és értékelése

4.1. A GPC-API-MS és a GPC-API-MS/MS megvalósítása

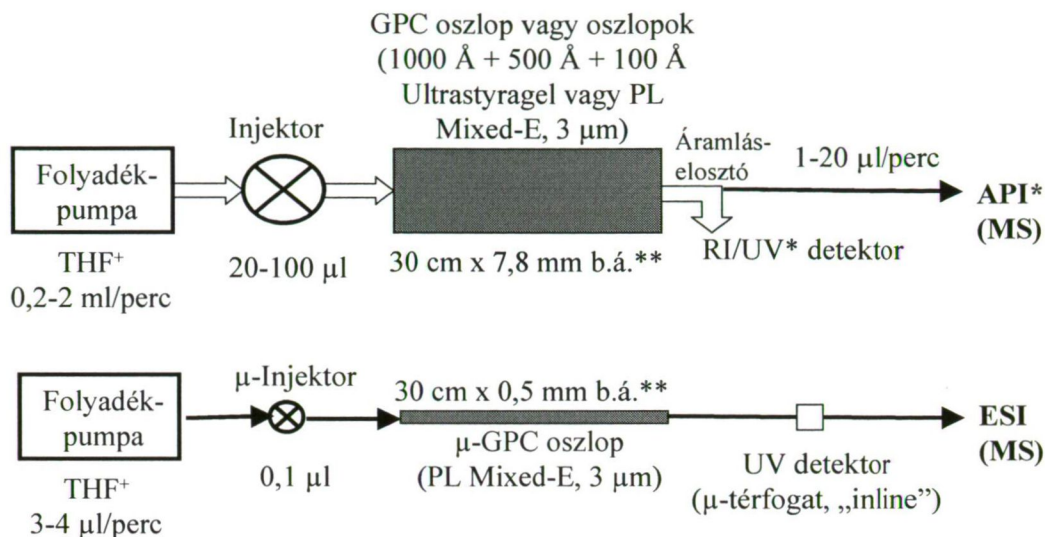
A széles molekulatömeg-eloszlású szintetikus polimerek közvetlen tömegspektrometriás elemzése során jelentkező problémák kiküszöbölésére bevezettem a tömegspektrometria és a GPC online kombinációját [125]. A módszer előnyei különösen ESI alkalmazása esetén (többszörösen töltött ionok képződése következtében) voltak jelentősek, de munkánkat követően a MALDI módszerrel kapcsolatban is elterjedt a GPC felhasználása, közvetett (off-line) kombinációban [151]. A GPC-ESI-MS lehetővé tette egyes, már formulázott polimer termékek oligomer komponenseinek és adalékainak közvetlen meghatározását is [126]. A szintetikus oligomerek tömegspektrometriájában elért tudományos eredményeim jelen dolgozatban történő összefoglalásában és értékelésében ezért a GPC-ESI-MS és az ugyancsak egy API-t felhasználó GPC-APCI-MS módszerekre helyeztem a hangsúlyt.

A GPC-API-MS-t számos változatban valósítottam meg, illetve közvetlenül: közreműködtem azok megvalósításában. Ezeket a módszereket vázlatosan az **1. ábrában** foglaltam össze. A GPC-ESI-MS megvalósítása során elsőként alkalmaztam olyan technikai megoldásokat, amelyek (a módszer megvalósításában betöltött úttörő munkám elismerése mellett [152]) számos, nem polimeranalitikai jellegű hivatkozást is kaptak. Egy szöveggörnyezeti hivatkozás [153] például kiemeli, hogy SEC-API-MS alkalmazása esetén „Prókai és Simonsick munkája [125] alapján ma már bevált módszer nátriumionok hozzáadása az ionizáció elősegítésére”.

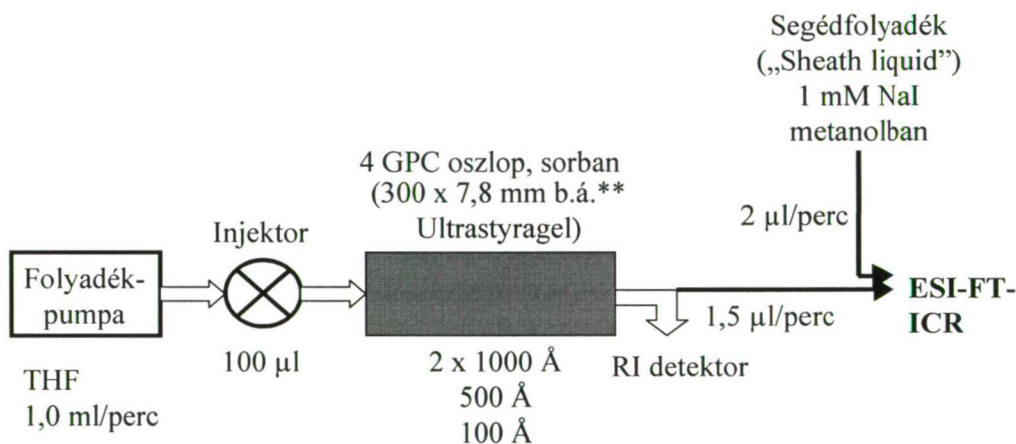
A **2. ábra** szemlélteti a kombinált módszer hatékonyságát [10]. Az oktilfenol polietoxietanol (PEOE) éterének közvetlen ESI vizsgálatával (2a. ábra) nem detektálhatók a molekulatömeg-eloszlási görbe két végén azok az oligomerek, amelyek GPC-ESI-MS elemzéssel (2b. ábra) egyértelműen kimutathatók (2c. and 2d. ábrák). Az alkalmazott kromatográfiás körülmények között a 3D-ioncsapdás készülékkel (LCQ) készített egyetlen online tömegspektrum („single scan”) 6–10 oligomer jelenlétét mutatja. A 2c. ábra legintenzívebb ionja (m/z 1148) az $n=72$ oligomer $[M+3Na]^{3+}$ ionja, míg a 2d. ábrán a legnagyobb gyakorisággal az $n=23$ oligomer $[M+Na]^+$ ionja (m/z 1242) detektálható.

Az ESI-MS-re alapozott molekulatömeg-specifikus detektálást kihasználva új kalibrációs eljárást vezettem be a polimer átlagos molekulatömegének és

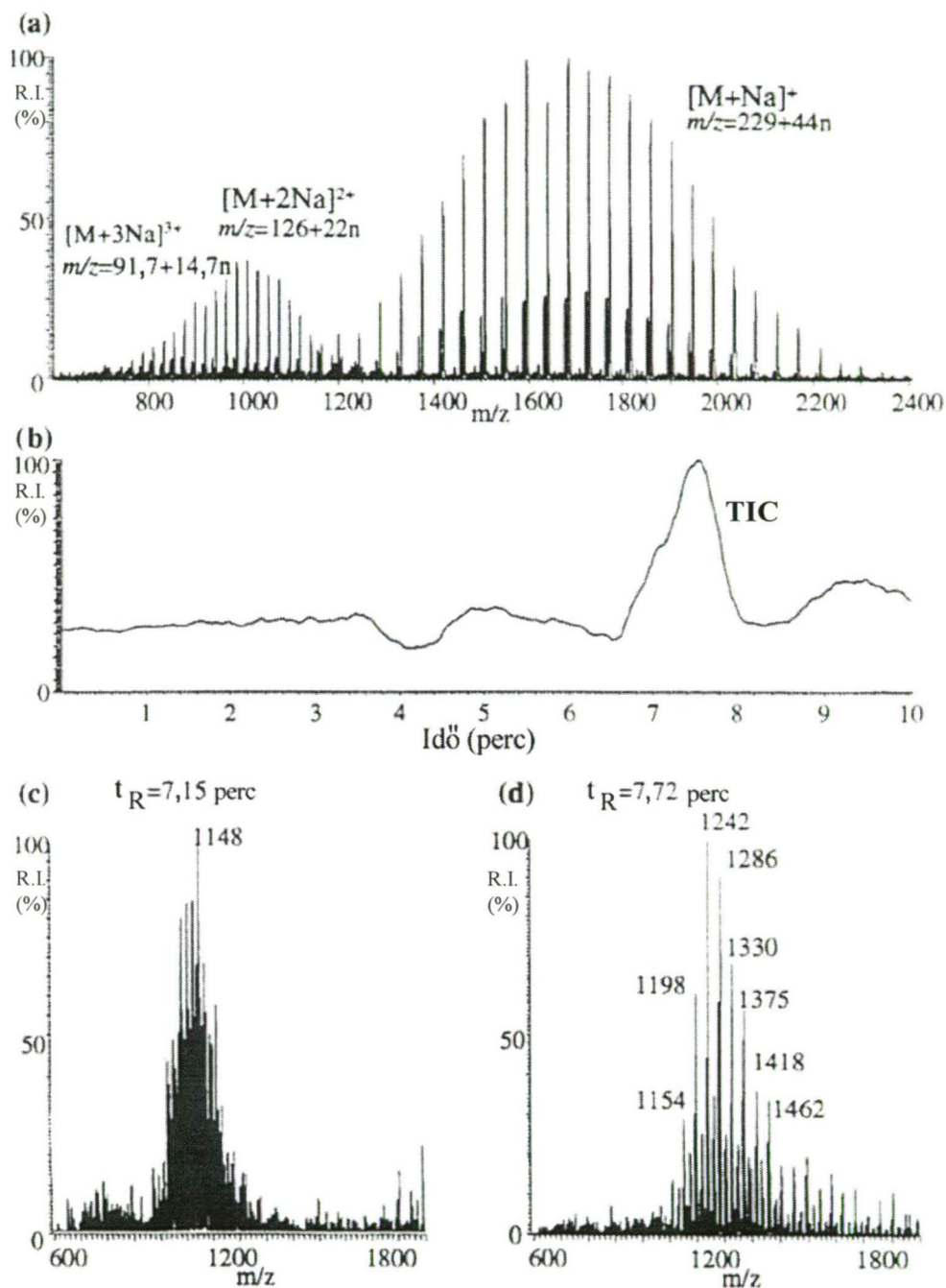
- A) Az ionizációt elősegítő reagens (ha szükséges) az eluensben feloldva
 – A legegyszerűbb megvalósítás; MS: kvadrupólusos analízátor vagy ioncsapda



- B) Az ionizációt elősegítő reagens a GPC elválasztás után adagolva, nagy kromatográfiás (4 GPC oszlop) és tömegspektrometriás (FT-ICR) felbontás alkalmazásával



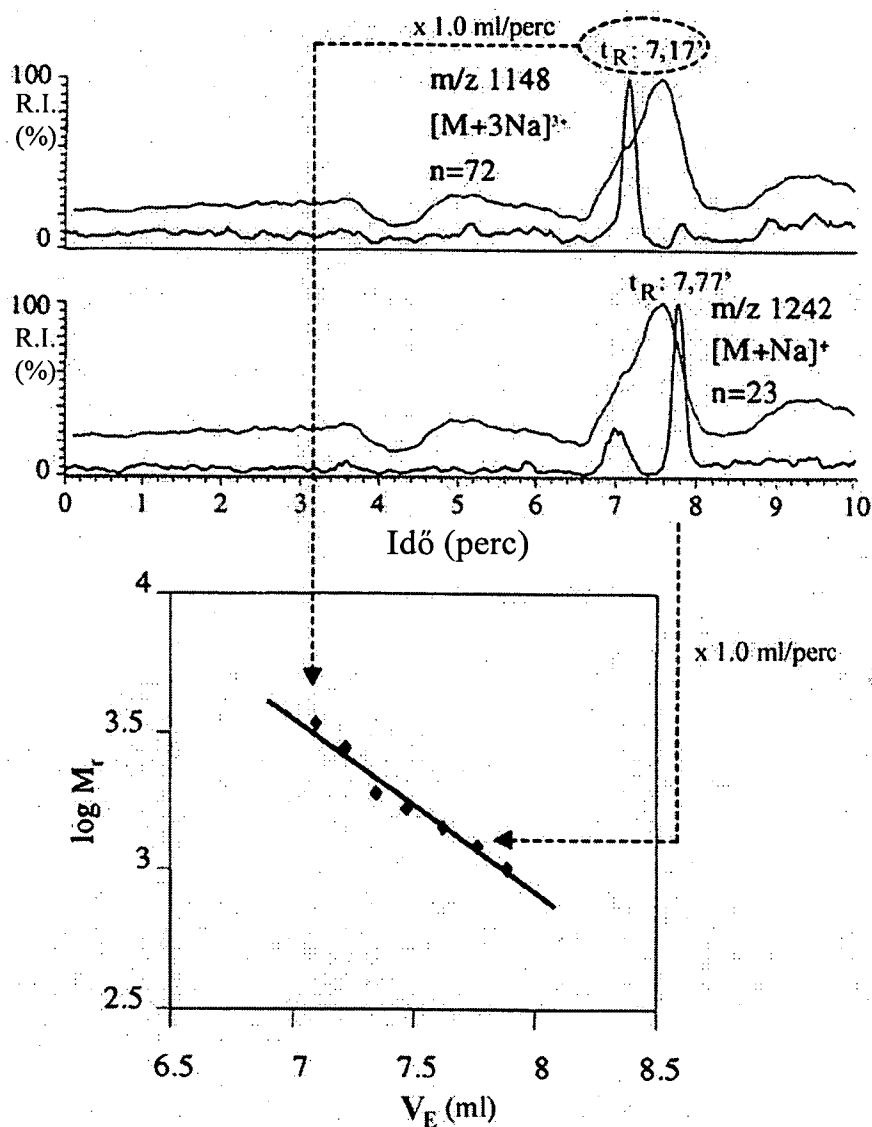
1. ábra. Az online GPC–API-MS gyakorlati megvalósításának elvi vázlata.
 API: Atmoszférikus nyomáson végrehajtott ionizáció, amely lehet ESI vagy atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (APCI); THF: tetrahydrofuran; 10^{-4} – 10^{-5} M NaI az eluensben feloldva; *RI: Refraktív index, UV: Ultraibolya spektrofotometriás detektor; b.á.: belső átmérő.



2. ábra. Egy felületaktív anyagként alkalmazott oligomer oktilfenol-PEOE éter (a) ESI tömegspektruma (kromatográfiás elválasztás nélkül), GPC-ESI-MS elemzése: (b) Összesion-kromatogram (TIC), valamint a (c) 7,15 perc és a (d) 7,72 perc retenciós időknél (t_R) felvett ESI tömegspektrumok. Körülmények [10]: 1. ábra A változat – GPC: 30 cm x 7,8 mm b.á. PL 3 μ m Mixed-E oszlop, 1 ml/perc THF⁺; MS: ioncsapda (LCQ). R.I. = relatív intenzitás (relatív gyakoriság).

molekulatömeg-eloszlásának GPC-vel történő pontos meghatározására, amely alapelvét (a 2. ábrán bemutatott elemzés adatait felhasználva) a **3. ábrán** szemléltettem. Ez utóbbi módszer azon alapul, hogy a kromatográfiás elválasztás során folyamatosan felvett és elektronikusan tárolt tömegspektrumokból szelektíven rekonstruálhatók a detektálható egyes oligomerek elúciós profiljai és meghatározhatók ezeknek pontos elúciós térfogatai is (V_E); így a molekulatömeg logaritmusának ($\log M_r$) a V_E -re történő kalibrációját magával a mintával végezhetjük el (belső kalibráció, ellentétben a polisztirol oligomereket alkalmazó külső és csupán közelítő kalibrációval). A tömegspektrometriás detektálással párhuzamosan alkalmazott törésmutató („refraktív index”, RI) detektor jele viszont, ellentétben a tömegspektrométerrel, mennyiségileg megbízható; így az átlagos molekulatömegek, molekulatömeg-eloszlások meghatározása a GPC-ESI-MS segítségével meghatározott $\log M_r$ - V_E belső kalibráció ismeretében nagy pontossággal elvégezhető (**1. táblázat**). Kihasználva azt, hogy a GPC-ben az elválasztás a molekulák hidrodinamikus térfogata szerint történik, ESI detektálás felhasználásával különböző oligomerarchitektúrákat (például lineáris, ciklikus, hiperelágazó, stb.) is összehasonlíthatunk [129].

Megvizsgáltam mind a tömegspektrometria [127], mind a kromatográfia oldaláról [128] hogy módszerünk hatékonysága és a teljesítőképessége miként növelhető. Az FTICR által elérhető nagy felbontás lehetővé tette olyan kopolimerek elemzését is, amelyek más tömegspektrométerekkel mérve és elválasztási eljárások alkalmazása nélkül nem nyújtanának értelmezhető információkat. A **4. ábra** egy polidiszperz ($PD \sim 2,15$) vinil-terminált GMA/BMA kopolimer ESI analízisét mutatja be, összehasonlítva a közvetlen (elválasztás nélküli) és az online GPC alkalmazásával kapott eredményeket. A közvetlen ESI elemzéssel készített felvételtől (4a. ábra) megállapítható, hogy az oligomerek túlnyomó része ($>98\%$) vinil-terminált és, mint a csillaggal megjelölt oligomerek végcsoportja, detektálható a 2,2-azobisz(izobutironitril) (Vazo) gyökös iniciátor is. Többnyire azonban a különböző polimerizációs fokú (tehát „ m ” molekulatömegében is különböző) és eltérő („ z ”) töltésű oligomerek jelei még viszonylag nagy felbontás ($m/\Delta m \sim 80000$) alkalmazásakor is „átfedik” egymást (NB., a tömegspektrométerek analizátora nem m , hanem m/z szerint választja szét az ionokat). Például a $[GMA/BMA]_{24}+2Na]^{2+}$ ion ($z=2$) átlagos tömege kétszerese az $[GMA/BMA]_{12}+Na]^{+}$ ion ($z=1$) átlagos

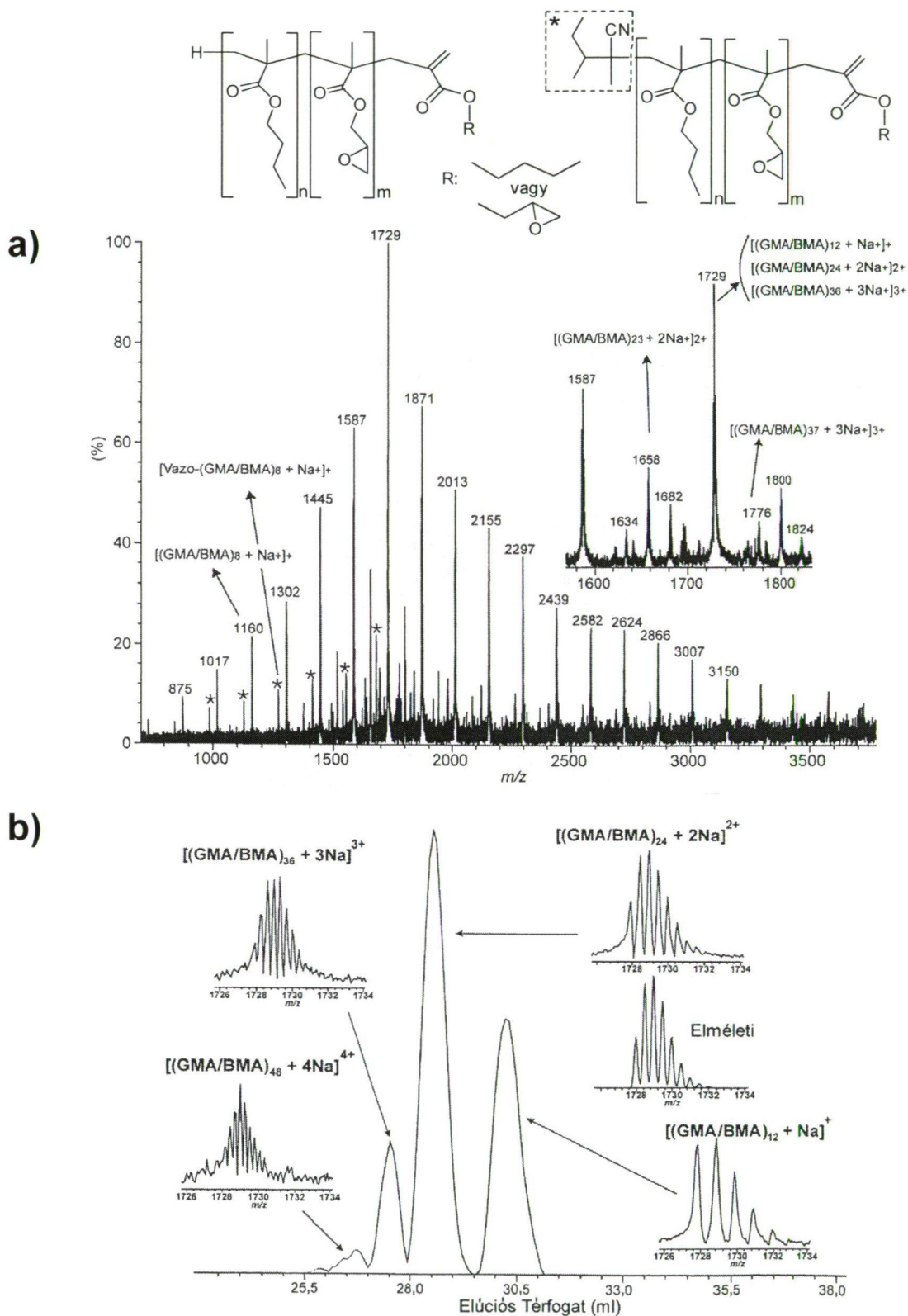


3. ábra. Az online ESI-MS-SIM detektálás segítségével történő GPC kalibráció elvi vázlata oktilfenol-PEOE éter oligomerekkel (2. ábra) szemléltetve [10].

1. táblázat. Az oktilfenol-PEOE éter ESI tömegspektrometriával, polisztirollal kalibrált GPC, illetve online GPC–ESI-MS kalibráció segítségével végzett GPC elemzéseiből kapott átlagos molekulatömegek és polidiszperzitás (PD) összehasonlítása [11, 125].^a

	M_n	M_w	PD
ESI tömegspektrometria (GPC nélkül)	1736	1771	1.02
GPC, polisztirol kalibráció	2001	2162	1.15
GPC, online ESI-MS kalibráció	1971	2016	1.08

^a M_n a szám szerinti molekulatömeget, M_w a súly szerinti átlagos molekulatömeget, PD a polidiszperzitást (M_w/M_n) jelöli.



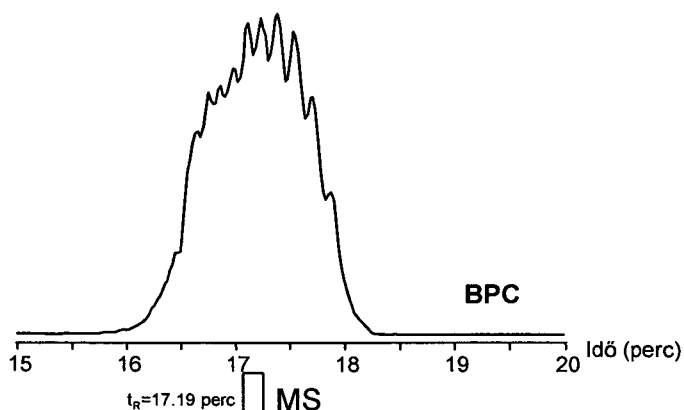
4. ábra. a) Közvetlen mintaelemzéssel kapott ESI-FTICR tömegspektrum;
b) GPC-ESI-FTICR kiválasztott ionkromatogramok és a hozzájuk tartozó tömegspektrumok az m/z 1726–1734 Th tartományban. (*: Vazo).
Körülmények: 1. ábra B változat [127].

tömegének, tehát mindkettő m/z 1729-nél jelenik meg. GPC–ESI-FTICR elemzéssel a különböző oligomerizációs fokú termékek különböző V_E -nél detektálhatók, így ionjaik átfedése megszűnik (4b. ábra). A GMA és BMA monomerek tömege viszont egymástól csupán 0,036 atomi tömegegységgel (u) különbözik, ezért izobár ko-oligomerjeik (például a GMA_6BMA_6 és a GMA_5BMA_7 , stb.) tömegspektrometriás megkülönböztetéséhez extrém nagy FTICR felbontás ($m/\Delta m > 500000$) szükséges [154].

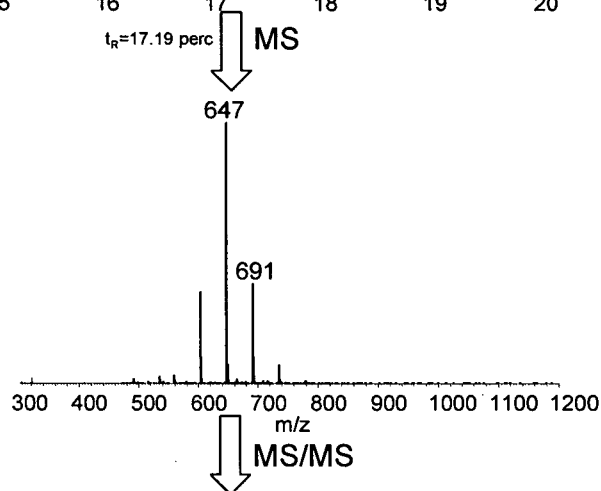
A kombinált módszer (GPC–ESI-MS) kromatográfiás hatékonyságának növelését is sikeresen megoldottuk mikrooszlopok alkalmazásával [128]. A hagyományos módszerhez képest a μ -GPC kétségtelen előnye lenne a nagyobb kromatográfiás hatékonyság, az eluens felhasználás drasztikus csökkenése, a kis mintaigény és az egyszerűbben megvalósítható kétdimenziós kromatográfia lehetősége (GPC-t követően normál- vagy fordítottfázisú HPLC) [155]. Ugyan a kromatográfiás hatékonyságban kb. 15%-os növekedést értünk el μ -GPC (250 mm x 0,5 mm b.á. PL-Gel 3 μ m Mixed-E) bevezetésével egy széles körben alkalmazott GPC oszlophoz (300 mm x 7,8 mm b.á., a mikrooszloppal azonos töltet) viszonyítva, azonban még további optimalás szükséges ahhoz, hogy a nagyobb gyakorlatot és körültekintést igénylő mikrotechnika alkalmazása mindenki számára megtérüljön.

Az ESI tömegspektrumok felhasználásával szerkezeti információkat csak közvetett módon nyerhetünk. A GPC–API-MS lehetőségeit ezért a tandem tömegspektrometria (MS/MS), mint egy további dimenzió, hozzáadásával bővítettük [129]. Erre a bővítésre kiváló lehetőséget nyújtott az ioncsapdás készülékek elterjedése. Mivel a szintetikus oligomermolekulák nátrium-adduktjainak fragmentációs sajátságai kedvezőtlenek (főként a kis töredékion-hozam miatt [156]), ezért a GPC–APCI-MS/MS módszert elsőként APCI alkalmazásával valósítottuk meg. A tetrahidrofuranból (THF, 1. ábra) képződött reagensionok csakugyan elegendően kíméletes ionizációt eredményeztek a kiválasztott modell oligomerekre; például az oktilfenol-PEOE éter, és a képződött protonált molekulák ütközéssel kiváltott disszociációja (CID) elegendően hatékony volt egy ioncsapdás készüléken – még az online kromatográfia által diktált időskálán is (5. ábra). Ugyanakkor a módszer informatív tandem tömegspektrumokat eredményezett, ahogy azt a 5b. és 5c. ábra szemlélteti. Az MS/MS dinamikus (adatfüggő) felvételekkel, észrevehető

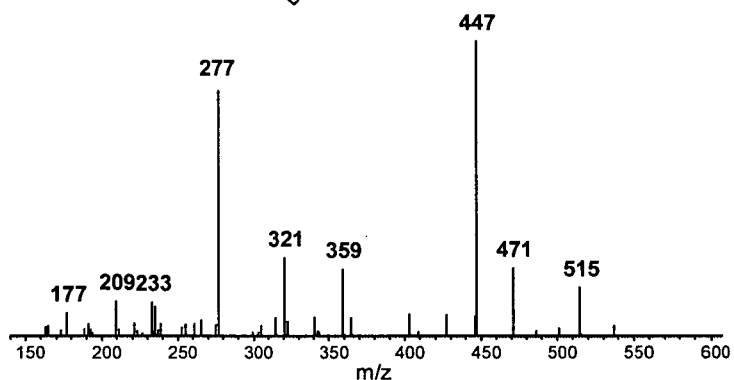
a)



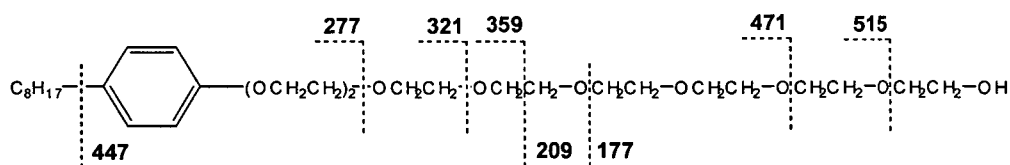
b)



c)



d)



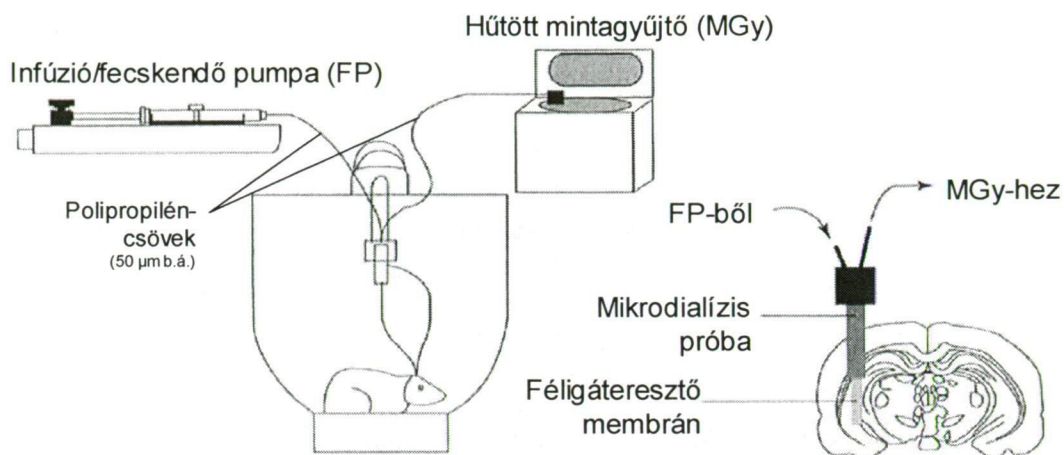
5. ábra. Egy oktilfenol-PEOE éter oligomerelegy (Triton® X-100) GPC–APCI-MS és programozott (adatfüggő) MS/MS analízise [129]: **a)** „Báziscsúcs” kromatogram (BPC, közelítőleg megfelel a TIC-nek); **b)** ESI tömegspektrum $t_R = 17,19$ percenél felvett ESI tömegspektrum; **c)** Az m/z 647 molekulaionról ($[M+H]^+$) készített CID-MS/MS spektrum, **d)** Az MS/MS spektrumban megjelent töredékionok lehetséges eredete. Körülmények: 1. ábra A változat – GPC: 2 db 30 cm x 7,8 mm b.á.: 30 cm x 7,8 mm b.á. PL 3 μ m Mixed-E oszlop, THF 1 ml/perc; MS: ioncsapda (LCQ).

információvesztés nélkül, az elválasztáshoz gazdaságosan illeszthető volt a korábban bevált GPC-API-MS adatgyűjtéshez.

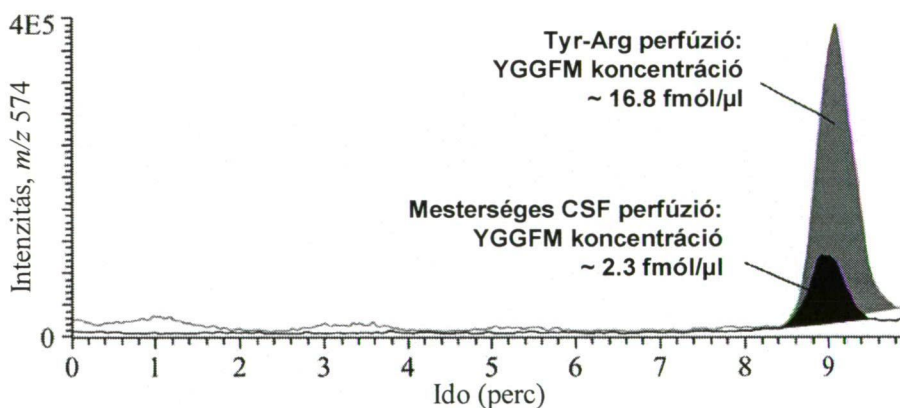
Röviden összefoglalva, a szintetikus oligomerek tömegspektrometriájában a megfelelő elválasztási eljárások alkalmazása rendkívül fontos, amely különösen a nagy polidiszperzitású makromolekulás anyagok vizsgálata esetében a kiértékelésben jelentős javulást eredményez. Bevezettem az API-MS és a GPC on-line kombinációját, és sokoldalú fejlesztéseink eredményeként ez a módszer tekinthető napjaink műszeres polimeranalitikájában az egyik leghatékonyabb eljárásnak.

4.2. A neuropeptidek és neuropeptid-metabolizmusok vizsgálata

Saját kutatásaimban, felismerve az eljárásnak az irodalmi áttekintés 2.2. fejezetében említett egyedülálló előnyeit, kísérleti állatok (patkány) agyából történő mintavételre előszeretettel alkalmaztam *in vivo* mikrodialízist. A laboratóriumomban meghonosított módszert a **6. ábrán** szemléltettem [41]. A mintavétel általában 5–30 perces intervallumokban történt szeptumos (zárt) 150 µl-es üvegfiolákba egy programozható mintagyűjtő segítségével, amely egyúttal hűtötte is az üvegfiolákat (3 °C-ra). A módszer neuropeptidekre való felhasználhatóságát egy ismert opioid peptid, Met-enkefalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met ~ YGGFM a peptidszekvenciát az aminosavak három-, illetve egybetűs kódjaival megadva) a patkányagy globus pallidus régiójából gradiens LC-ESI-MS segítségével történt kimutatásával igazoltuk (**7. ábra**). Neuropeptidek kimutatása egyedül általában nem sok biológiai vagy farmakológiára vonatkozó tartalommal bír. Az *in vivo* mikrodialízis azonban nem csak mintavételre, hanem a kísérleti vegyületeknek az agy extracelluláris folyadékközegébe történő szabályozott és a mintagyűjtéssel egyidejű bejuttatására („retrodialízis”) is alkalmas. E két ellentétes irányú transzportra alapozva igazoltuk, hogy a „kyotorfin”-ként ismert Tyr-Arg endogén dipeptid valóban stimulálja élő és teljesen funkcionáló patkányban (*in vivo*) a Met-enkefalin elválasztást az agy globus pallidus régiójában, amely jelenséget előzőleg csak *in vitro* kísérletekkel tudtak kimutatni [157]. Az utóbbi módszerrel kapott eredmények az izolált agyszövet *post mortem* jellege és a tömegspektrometriánál sokkal kevésbé szelektív analitikai módszer alkalmazása miatt is kétségesek. A kyotorphin bioszintézisét L-tirozinból, L-argininből és adenosin trifoszfátból (ATP) Mg^{2+} jelenlétében a kyotorfin szintetáz végzi, és a bioszintetizált dipeptid (mint azt *in vivo* kísérleteink most már egyértelműen igazolták) az



6. ábra. Az *in vivo* mikrodialízis elvi vázlata az agyból történő mintagyűjtésre (kísérleti állat: patkány).

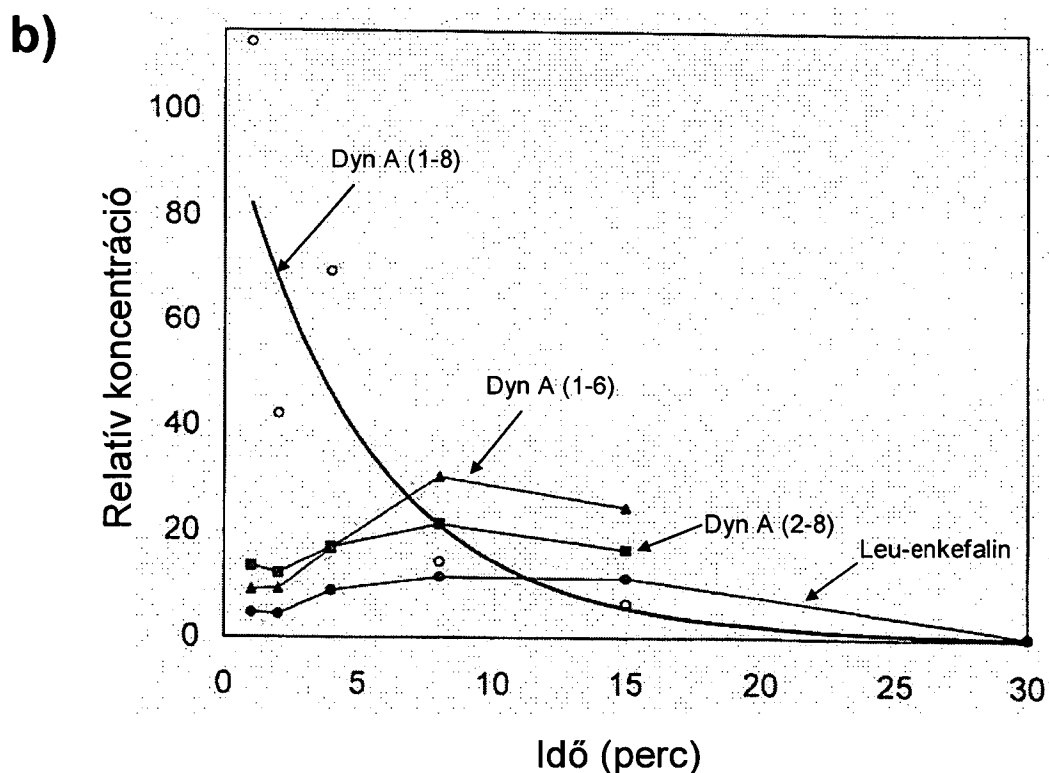
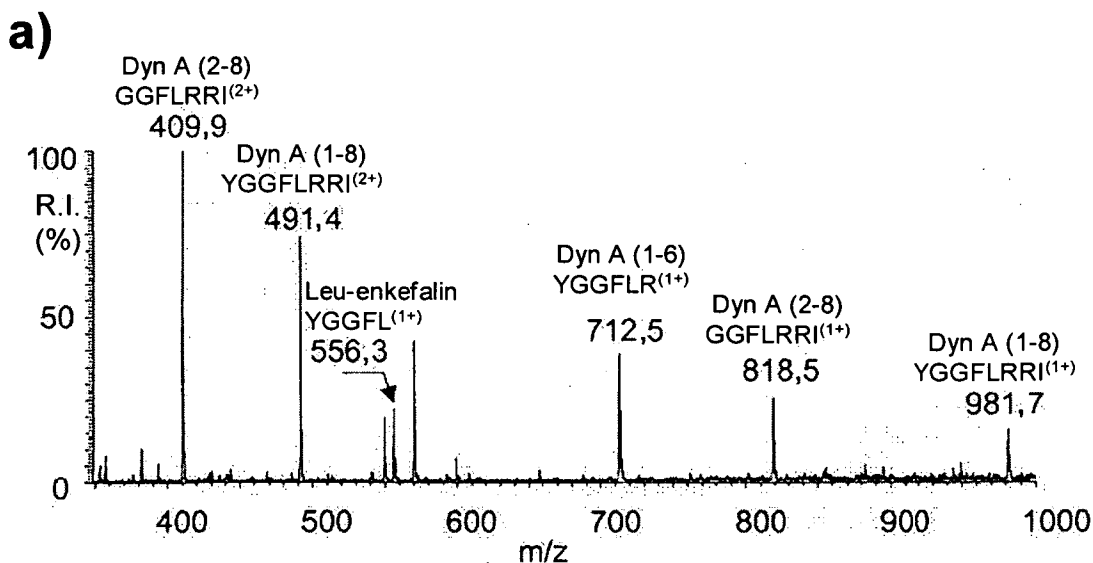


7. ábra. Met-enkefalin (YGGFM, m/z 574) meghatározása *in vivo* patkányagy (globus pallidus) mikrodializátumokban LC–ESI–MS–SIM módszerrel. A sötét csúcs alatti terület nagysága a mesterséges CSF perfúziója (kontroll, 2 µl/perc), a szürke csúcs alatti terület nagysága a kyotorfint (a Tyr-Arg dipeptidet, 5 nmól/µl) tartalmazó mesterséges CSF perfúziója során gyűjtött minta YGGFM-koncentrációját tükrözi [41].

érzéstelenítő hatású Met-enkefalin felszabadulását eredményezi, tehát alkalmas farmakológiai célpont lehet egy új típusú fájdalomcsillapító kifejlesztésére [158].

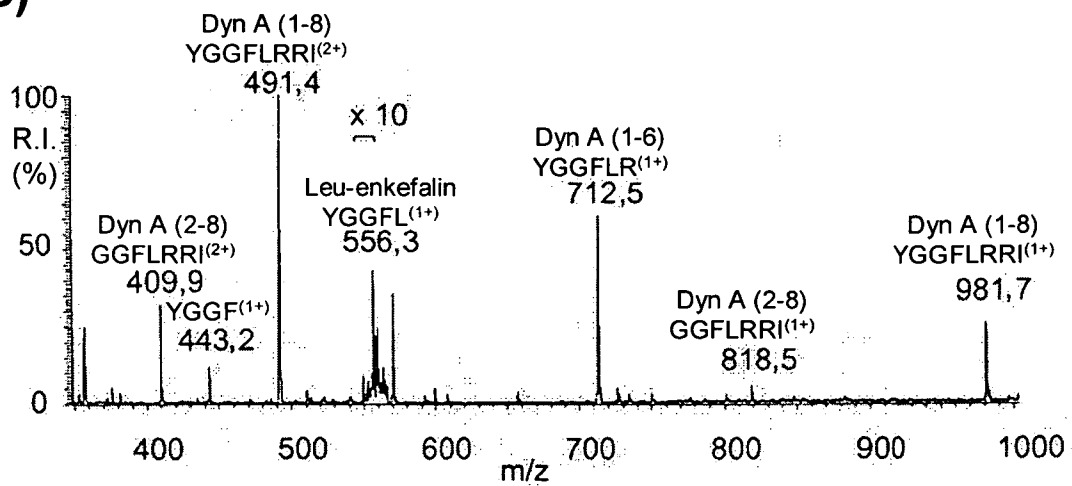
Az *in vivo* mikrodialízist alkalmaztam különféle dinorfinok [131] és néhány szintetikus szomatosztatin analóg [132] agyszövetben lejátszódó extracelluláris metabolizmusának tájékoztató vizsgálatára is. Bizonyos dinorfinok, például a Dyn A (1-13) és a Dyn A (1-11), extracelluláris metabolizmusa megismerhető volt egy rutin kvadrupólusos készüléket alkalmazva csupán ESI tömegspektrometriával – azaz kromatográfiás elválasztás nélkül – különösen ESI-FTICR alkalmazásával. A Dyn A (1-12) bonyolult *in vivo* extracelluláris metabolizmusának felderítéséhez azonban szükséges volt LC-ESI-MS alkalmazása is. Az *in vivo* mikrodialízist alkalmazó peptidmetabolizmus tanulmányok tájékoztató jellege abból adódik, hogy a szubsztrátum (peptid) retrodialízissel történő bejuttatása és az agyban keletkezett metabolitok folyamatos gyűjtése egy összetett folyamat következménye. Ebben, a művelet választható paraméterein (peptidkoncentráció és perfúziós térfogatáram) kívül, a peptid és *in vivo* metabolitjai fizikai-kémiai tulajdonságainak (molekulatömeg- és térfogat, nettó töltés, hidrofób sajátságok, konformáció, stb.), valamint ezek mikrodialízis-membránon keresztüli és egy heterogén élő szövetben történő diffúziójának is jelentős szerepe van. Ez utóbbi jelenség figyelembe vételéhez és egzakt értelmezéséhez jelenleg nem rendelkezünk elegendő ismeretekkel. Egy adott neuropeptid különféle (membránhoz kötött ektoenzimek, vagy az intersticiális közegbe kiválasztott) enzimek által katalizált metabolizmusának egymáshoz rendelése és/vagy azok szöveten belüli lokalizálása tehát, teljes biztonsággal, gyakorlatilag lehetetlen. Ezért, a metabolizmusukra vonatkozó tájékoztató *in vivo* mikrodialízist alkalmazó vizsgálatokat [131] követően, *in vitro* modelleken tanulmányoztam néhány dinorfin szinaptikus struktúrákban (szinaptoszómák, szinaptikus plazma membrán frakció) [132] és endotélsejtekben lejátszódó (azaz többé-kevésbé lokalizált) metabolizmusát [133].

A Dyn A (1-8) (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile ~ YGGFLRRI) szinaptikus metabolitjainak azonosítására elsőként kutatócsoportom alkalmazta az ESI tömegspektrometriát egy kísérleti állat agyának szubcelluláris frakcionálásával nyert szinaptoszómák és szinaptikus plazmamembrán frakció felhasználásával végzett kísérletekkel (8. ábra) [132]. A metabolizmus kinetikájának vizsgálatára (a GPC-ESI-MS fejlesztésének előző fejezetben ismertetett tapasztalataimat felhasználva) egy

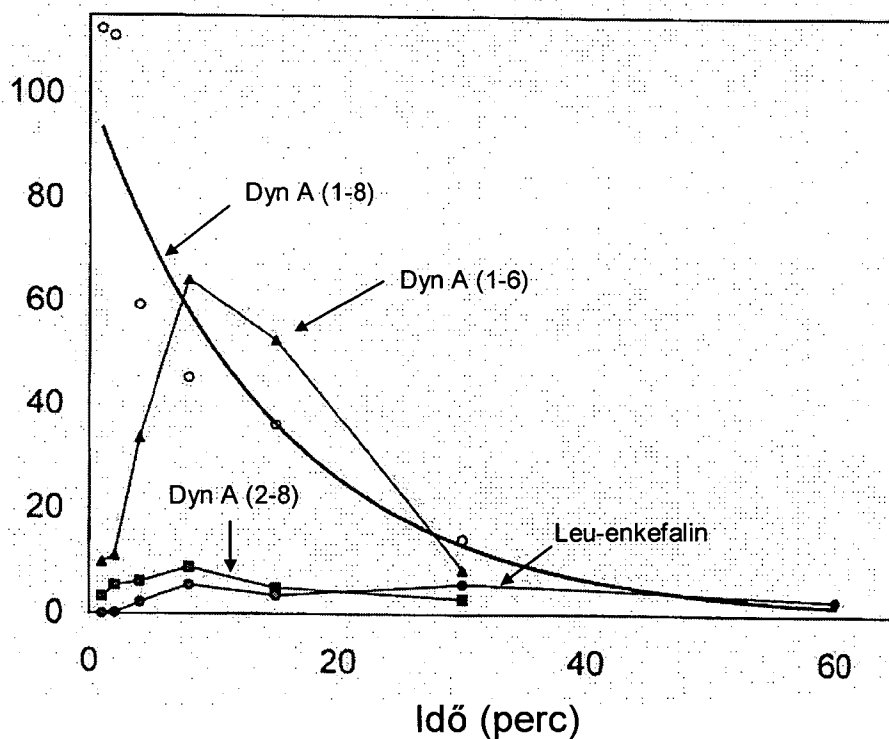


8. ábra. A Dyn A(1-8) neuropeptid (YGGFLRRI) metabolizmusa 37 °C-on patkányagból izolált szinaptoszómák (a és b diagramok) és szinaptikus plazma membrán szuszpenziójában (c és d diagramok, következő oldal). Az ESI tömegspektrumok (a és c diagramok) 8 perc inkubáció után készültek. A kinetikai profilok (b és d diagramok) SEC–ESI-MS/MS segítségével végzett mennyiségi meghatározások eredményeit foglalják össze [132].

c)



d)



8. ábra. (folytatás az előző oldalról). MS: Ioncsapda (LCQ); SEC: Asahipak GS-310M 10 cm x 7.8 mm b.á. oszlop, metanol/víz/ecetsav (69.5/29.5/1, v/v) mobilfázis, 250 $\mu\text{L}/\text{perc}$. MS/MS, kiválasztott reakciókövetés (SRM): Dyn A (1-8) m/z 491,5 \rightarrow 435,5; Dyn A (2-8) 409,9 \rightarrow 353,0; Dyn A (1-6) m/z 712,5 \rightarrow 695,1; Leu-enkefalin m/z 556,3 \rightarrow 424,9; [D-Ala², D-Leu⁵]enkefalin (belső standard) m/z 570,0 \rightarrow 438,0.

gyors, SEC-ESI-MS/MS-en alapuló módszert is kidolgoztam. Ennek segítségével megmutattuk, hogy a dinorfin (Dyn) A (1-8) szinaptikus metabolizmusának főterméke a Dyn A (1-6) (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg ~ YGGFLR). Specifikus peptidáz-inhibitorok felhasználásával történt részletes kinetikai mérésekkel később megállapítottuk, hogy a Dyn A (1-8) szinaptikus metabolizmusában számos neuropeptidáz vesz részt (2. táblázat), amely folyamatokat a 9. ábrán foglaltam össze.

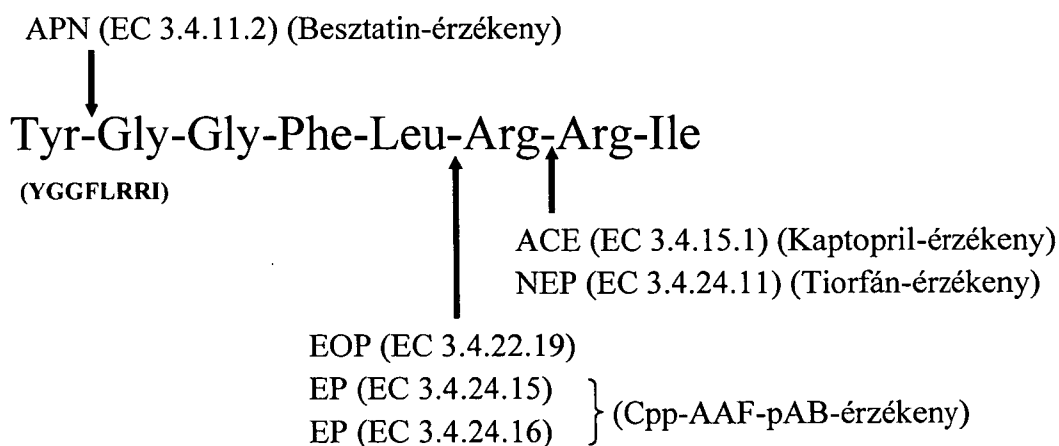
A peptidmetabolizmusok vizsgálatára bevezetett eljárásunk számos más szerv és szubcelluláris frakció (citoplazma, mitokondrium, endoplázmatis retikulum) esetén is alkalmazható. Bizonyos sejtek vagy sejtalkotók viszont frakcionálással nem választhatók el. Egy tipikus példa erre az esetre az vér-agy gát, amelynek a vérkeringés és a központi idegrendszer közötti molekulatranszport szabályozásában van fontos szerepe [159]. Az vér-agy gát morfológiai komponensei az egymáshoz szorosan illeszkedő endotélsejtek, amelyek metabolikus aktivitása az endotélsejtek molekulatranszportot (így a neuropeptidek áthaladását is) korlátozó funkciójának fontos komponense. Az endotélsejtek a szövetekből azonban csak rendkívül kis, metabolizmust célzó kísérletekhez elégtelen hozammal izolálhatók – viszont eredményesen tenyészthetők *in vitro*. A szinaptikus metabolizmus tanulmányozására kifejlesztett ESI-MS és MS/MS módszerek adaptálásával kutatócsoportom elsőként vizsgálta meg néhány dinorfin metabolizmusát endotélsejt-kultúrában [133]. Az alkalmazott *in vitro* körülmények közt csupán a Dyn A (1-8) metabolizmusa volt jelentős mértékű. Specifikus peptidáz inhibitorokkal végzett kísérleteink megmutatták, hogy főként besztafin-érzékeny aminopeptidázok, tiorfán- valamint cFPAAF-pAB-érzékeny endopeptidázok vesznek részt a folyamatban, amelyek terméke a Dyn A (1-7), Dyn A (1-6) és Dyn A (1-5) (valójában Leu-enkefalin) (lásd 9. ábra). Ezek a peptidázok képezik tehát a metabolikus gátat a Dyn A (1-8) számára a vizsgált endotélsejtekben.

Röviden összefoglalva, a neuropeptidek tömegspektrometriás analitikájában a biológiai alkalmazásokra helyeztem a hangsúlyt. Az bevezetett *in vitro* és *in vivo* technikák azonban a gyógyszerkutatásban is sokoldalúan felhasználhatók [160], és számos orvosi-kémiai jellegű munkámhoz nyújtottak már hathatós segítséget [161–165].

2. táblázat. A Dyn A (1-8) neuropeptid metabolizmusának kinetikája patkányagyból izolált szinaptikus plazma membrán szuszpenziójában különböző peptidáz-inhibitorok jelenlétében.

Inhibitor	Enzim	k (perc ⁻¹) ^a	F (%) ^b
–	–	0,339 ^c	–
Besztatin	Aminopeptidáz N (APN)	0,167	51 ± 13
Kaptopril	Angiotenzin-konvertáló enzim (ACE)	0,226	33 ± 13
Tiorfán	Neutrális endopeptidáz (NEP)	0,294	12 ± 3
Cpp-AAF-pAB	Endopeptidáz (EP) 24.15	0,230	32 ± 12
GEMSA ^d	Karboxipeptidáz	0.355	–5 ± 2

^aPseudo-elsőrendű reakció sebességi állandója. ^bF(%)=(1-k/k₀)·100, az enzimgátlás mértéke (kísérleti hiba három párhuzamos mérésből számítva); ^ck₀; ^dNegatív kontroll: Dyn A (1-7) nem azonosítható, mint metabolit.



9. ábra. A Dyn A (1-8) szinaptikus metabolizmusa (A nyílak a peptidkötésnek az adott peptidáz vagy peptidázok által katalizált hidrolízisét jelölik). APN: Aminopeptidáz N, ACE: Angiotenzin-konvertáló enzim, NEP: Neutrális endopeptidáz, EOP: Endo-oligopeptidáz, EP: Endopeptidáz, EC: Enzim Kommisszió.

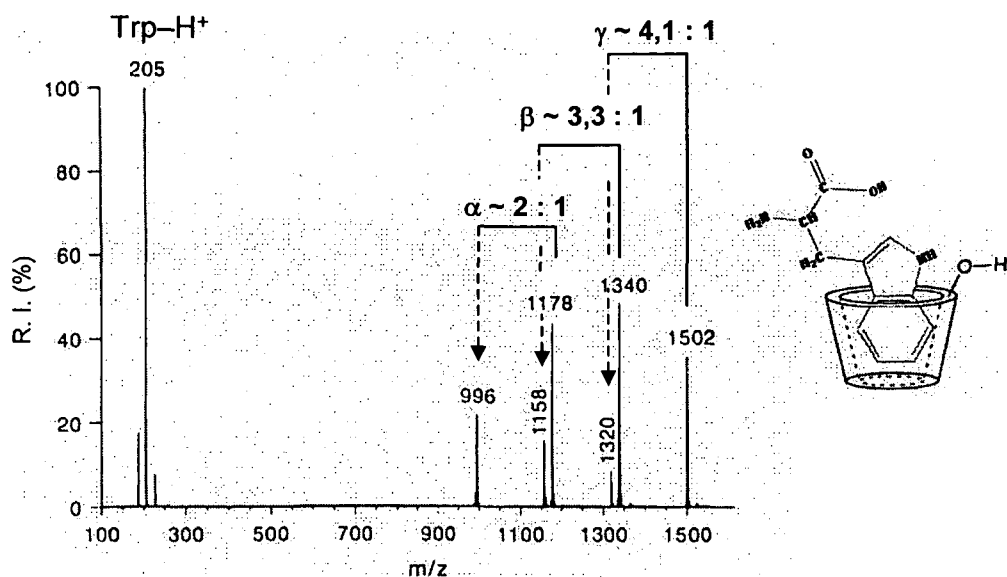
4.3. A ciklodextrin-komplexek ESI tömegspektrometriája

Ciklodextrin (CD) zárványkomplexek ESI tömegspektrometriával végzett vizsgálatában laboratóriumom használt fel elsőként egy olyan módszert, amely kompetíció elvén alapult [134]. A vonatkozó kísérletben a guest modellhez (triptofán, Trp, $M_r=204$) moláris feleslegben adtunk hozzá három ciklodextrin (α -CD, β -CD és γ -CD) ekvimoláris elegyét. A 10. ábra szemlélteti, hogy a molekulakomplexeket az ESI tömegspektrumban kizárólag protonált formában (α -CD-Trp- H^+ : m/z 1178, β -CD-Trp- H^+ : m/z 1340, és γ -CD-Trp- H^+ : m/z 1502), míg a ciklodextrineket kizárólag nátrium-adduktokként (α -CD+ Na^+ : m/z 996, β -CD+ Na^+ : m/z 1158, és γ -CD+ Na^+ : m/z 1502) detektáltuk. Ez arra utal, hogy az aminosavak protonaffinitása nagyobb, mint a ciklodextrinek kationaffinitása [58]. Az ábrán feltüntetett CD-Trp- H^+ /CD+ Na^+ ionintenzitás arányok utaltak a komplexképződés mértékére. Az ESI tömegspektrum tehát azt mutatta, hogy a β - és a γ -CD a protonált aminosav (guest) számára alkalmasabb befogadómolekulák (host), mint az α -ciklodextrin.

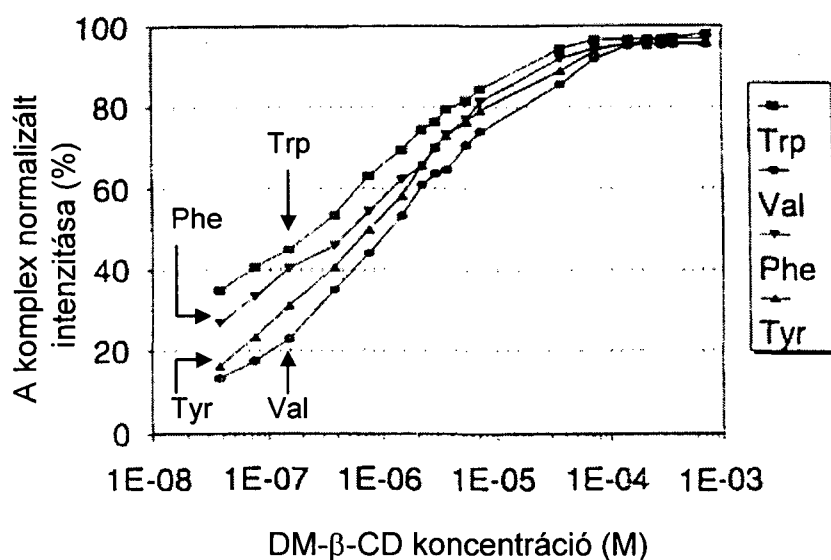
A kezdeti vizsgálatokat ESI-FTICR mérésekkel is kiegészítettük [135]. Nagy tömegfelbontás segítségével azt találtuk, hogy a gázfázisban az 1:1 sztöchiometriájú molekulakomplexek mellett kisebb mértékben 2:2 sztöchiometria is kimutatható. Ez a jel valószínűleg két 1:1 komplex gázfázisú asszociációjából származott. Megállapítottuk továbbá, hogy ESI tömegspektrometriás vizsgálatoknál egy kémiai módosított ciklodextrin, a heptakisz(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin (DM- β -CD), rendelkezett a legjobb komplexképző sajátságokkal.

A ESI segítségével mérhető komplexképződést megvizsgáltuk a guest szempontjából is. Egy titráláshoz hasonló eljárással megmutattuk, hogy a protonált aromás aminosavak (Trp és fenilalanin, Phe) alkalmasabb vendégmolekulák DM- β -CD számára, mint a protonált alifás aminosavak (például a valin, Val) [134] (11. ábra).

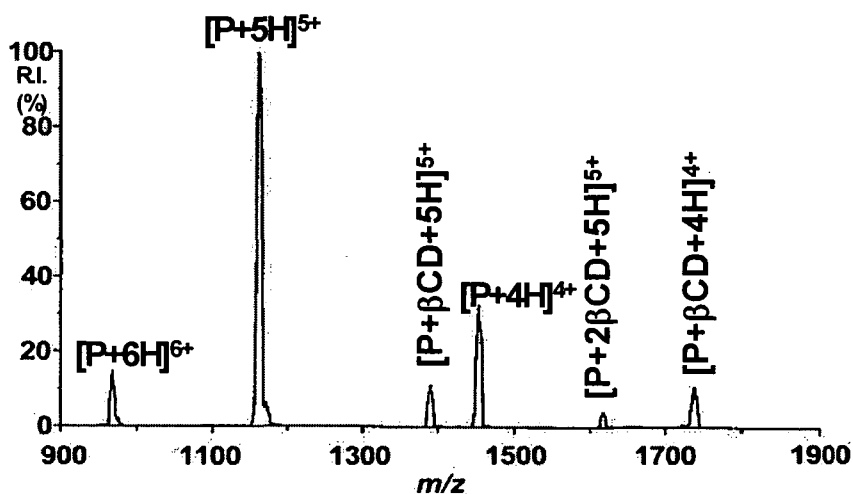
Bár egy egész peptid vagy fehérjemolekula nyilvánvalóan nem fér bele egy ciklodextrin belső üregébe, megfelelő komplexképző oldalláncok (Trp és Phe) megköthetnek ciklodextrint, és a peptid vagy fehérje molekula vízzoldhatóságának, asszociációjának, stabilitásának és/vagy membránon keresztüli transzportjának megváltozását eredményezhetik [51]. Vizsgálatainkban β -ciklodextrin feleslegre volt



10. ábra. Egy $1 \cdot 10^{-5}$ M triptofánt (Trp) és egyenként $1 \cdot 10^{-4}$ M α - β - és γ -ciklodextrint tartalmazó metanol/víz/ecetsavas (47,4/47,5/5 v/v) oldat ESI tömegspektruma [134].



11. ábra. A protonált aminosav-komplexek normalizált intenzitása az ESI tömegspektrumokban a DM- β -CD koncentráció függvényében. Az aminosav koncentrációja mindegyik kísérletben azonos ($5 \cdot 10^{-5}$ M) volt [134].

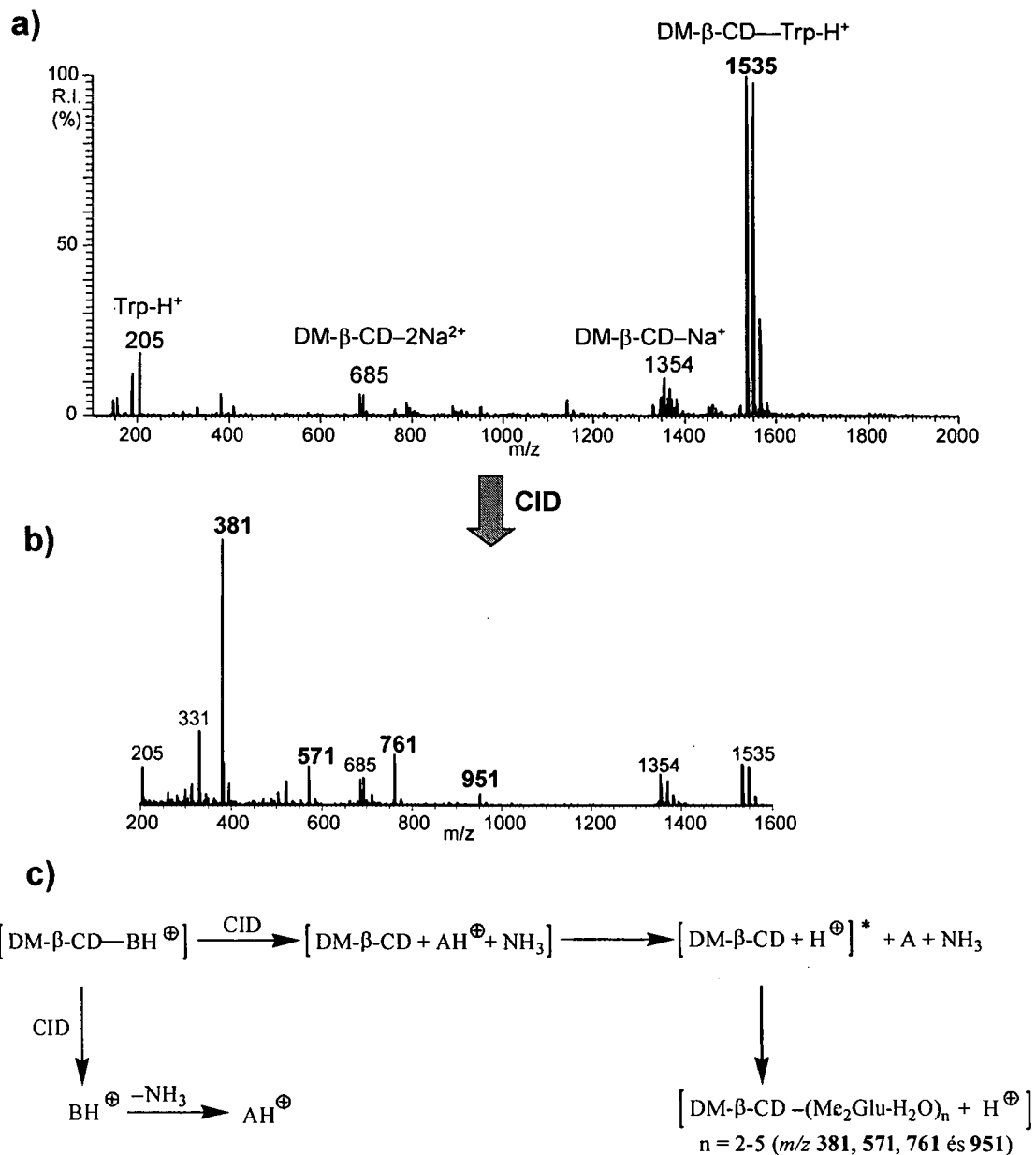


12. ábra. Fehérje-β-CD adduktok ESI tömegspektrometriás detektálása. Fehérje (P): rekombináns humán inzulin ($M_r = 5807,6$), $5 \cdot 10^{-5}$ M, β-CD, $1 \cdot 10^{-4}$ M; metanol/viz/ecetsavas (47,4/47,5/5 v/v) oldat .

3. táblázat. A DM-β-CD–protonált aminosav komplexek gázfázisú stabilitása egy kvadrupólusos tömegspektrométer ESI ionforrásában végzett (repeller–kollimátor) CID kísérletekkel [134].

Komplex	A komplexek 50%-ának disszociációjához szükséges E_{com} (eV) ^a	Az összes komplex disszociációjához szükséges E_{com} (eV) ^a
DM-β-CD–Trp-H ⁺	2,90	>4,0
DM-β-CD–Phe-H ⁺	1,13	2,1
DM-β-CD–Tyr-H ⁺	1,00	1,8
DM-β-CD–Val-H ⁺	0,90	1,3

^a E_{com} : tömegközéppontra vonatkoztatott energia, $\Delta V \cdot m_T / (m_P + m_T)$, ahol ΔV a repeller–kollimátor potenciálkülönbség, m_T az ütközési gáz és m_P a komplex tömege.



13. ábra. DM-β-CD-Trp-H⁺ adduktok **a)** ESI tömegspektrometriás detektálása és **b)** CID termékei ($E_{\text{com}} \sim 4$ eV, disszociáció az ionforrás repeller-kollimátor régiójában). Minta: $5 \cdot 10^{-5}$ M Trp és $5 \cdot 10^{-5}$ M DM-β-CD metanol/víz/ecetsavas (47,4/47,5/5 v/v) oldata.

c) A CID valószínűsített mechanizmusa DM-β-CD – protonált aminosavak adduktok gázfázisú stabilitásának vizsgálata során [166].

B: Aminosav; A: Deamidált aminosav (karboxilsav); Me₂Glu: 2,6-di-O-metilglükóz; *: Belsőenergia felesleg.

szükség, ahhoz hogy egy modell fehérjén (rekombináns humán inzulin, M_r 5807,6) az adduktképződést ESI tömegspektrometriával ki tudjunk mutatni (12. ábra) [135].

Felismertük, hogy a CID módszer a protonált ciklodextrin-komplexek gázfázisú stabilitásának meghatározására is használható. Úgy találtuk, hogy a meghatározott mértékű disszociációhoz szükséges energiák (3. táblázat) az oldatban mérhető komplexképződéshez (11. ábra) hasonló trendet mutatnak. Egy lényeges felismerésünk volt az is, hogy a CID folyamán protonátadás történik az aminosavról (guest) a ciklodextrinre (host), amely következtében protonált oligoszaharid-fragmensek válnak uralkodóvá a host-guest komplexek CID termékion-spektrumaiban (13. ábra). Bongiorno és munkatársai [166] további vizsgálatokkal (megfigyelésünkre szövegkörnyezeti hivatkozást adva) a jelenséget endoterm guest–host protontranszferrel és a guest-nek a ciklodextrin üregében lezajló fragmentációja (például semleges acetamid-molekula kilépése vagy deamidálás) folytán annak protonaffinitás-csökkenésével magyarázták. Ez egy elfogadható értelmezésnek tűnik az általunk vizsgált DM- β -CD–protonált aminosav komplexek esetében is (13c. ábra).

Röviden összefoglalva, a ciklodextrinek gyógyszer technológiai fontossága [50–53] számos kutatót ösztönzött tömegspektrometriás tanulmányok folytatására [56] – közöttük engem is. Bár a ciklodextrin-komplexek gázfázisú kémiája különbözhet a folyadékfázisban uralkodó folyamatoktól (például a hidrofób interakciók a gázfázisban, az oldatfázissal ellentétben, nem érvényesülnek és valószínűleg inkább a van der Waals valamint a hidrogénhíd-kötések dominálnak) [57], az ESI tömegspektrometriával végzett vizsgálatok azonban tendenciájukban általában igazolták a más módszerekkel oldatokban kapott eredményeket.

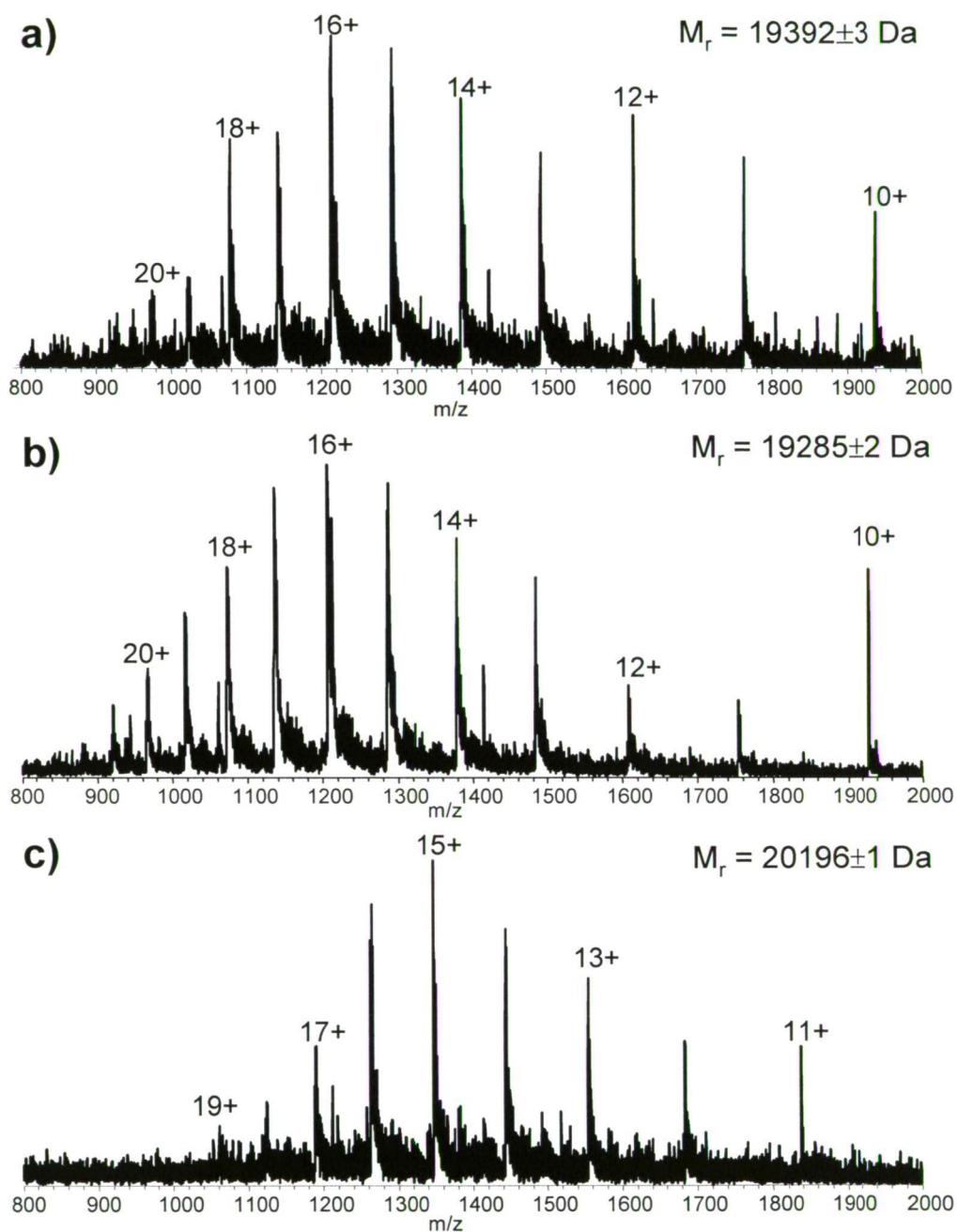
4.4. Izolált fehérjék tömegspektrometriás azonosítása és *de novo* szekvenálása

A tengeri rózsák (amelyek virágállatok osztályának *Zoantharia* rendjében az *Actinidae* családot képviselik) táplálékszerzésében fontos szerepet játszanak különféle mérgező polipeptidek vagy fehérjék, mint például a karib-tengeri *Stichodactyla helianthus* fajból IEF módszerrel izolált hemolitikus toxin [167]. Kem és Dunn [168] négyféle, citolizinnek (Sh-CI, Sh-CII, Sh-CIII és Sh-CIV) elnevezett izotoxint különített el carboximetilcellulóz kromatográfia felhasználásával és részleges N-terminális szekvenálást végzett Edman-degradációs módszerrel. Lanio és munkatársai [169] csak kétféle citolizint, elnevezésük szerint a sticholizin I (St I) és sticholizin II

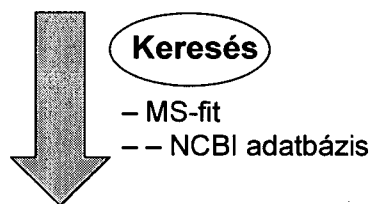
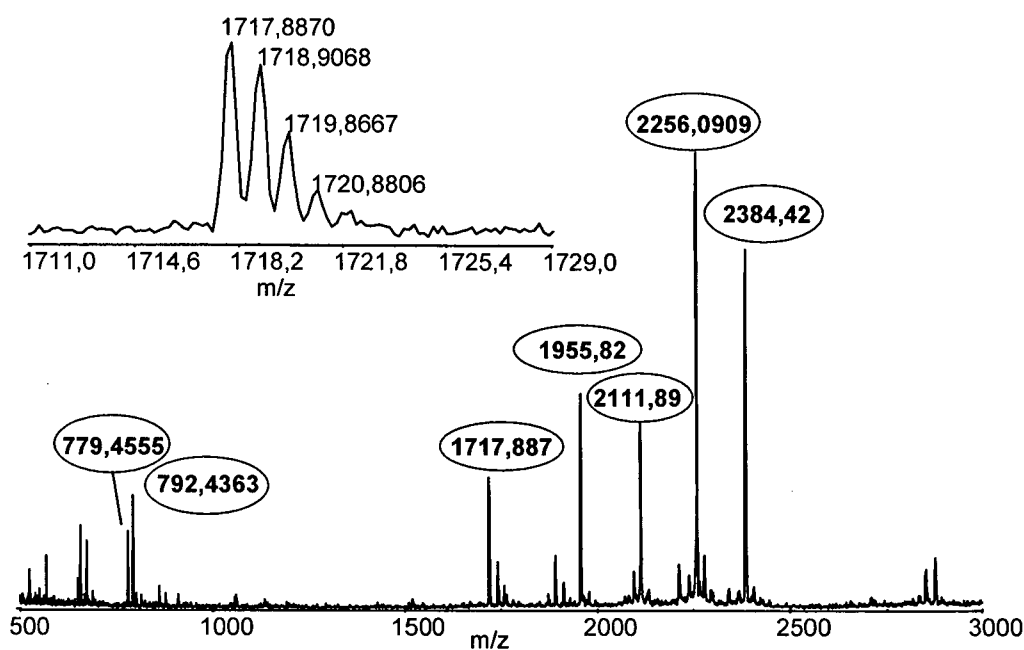
(St II) izotoxinokat, tudtak elkülöníteni. E két fehérjét azután gyakorlatilag teljesen szekvenálták (Edman módszerrel), és primer szerkezetüket molekulatömegek ESI-MS meghatározásával is igazolták. Az N-terminális szekvenciákat összehasonlítva az Sh-CII a St I-gyel, az Sh-CIII az St II-vel tűnt azonosnak. Az Sh-CI később az Sh-CII és az Sh-CIII különféle módosított formáiból álló keverékének bizonyult. SDS-PAGE vizsgálatokból valószínűsítették [168], hogy az Sh-CIV kb. 20-szal több aminosavból épül fel, mint a Sh-CIII, amely lehet egy részleges proteolitikus vagy alternatív RNS feldolgozás következménye is. Azt sem zárták ki, hogy az Sh-CIII és az Sh-CIV két különböző gén terméke is lehet [168]. Ezeknek a kérdések az Sh-CIV szekvenciájának részletesebb vizsgálatával és annak Sh-CIII-mal és Sh-CII-vel való összevetésével válaszolhatók meg. Ezt a feladatot a korábban használt Edman módszerhez hasonlóan MALDI-TOF és LC-MS/MS felhasználásával lényegesen gyorsabban és hatékonyabban oldottuk meg [136].

A **14. ábrán** bemutatott tömegspektrumok egyrészt igazolták (illetve pontosították) a korábban megállapított molekulatömeg-értékeket (Sh-CII: $M_r = 19392 \pm 3$; Sh-CIII: $M_r = 19285 \pm 2$) [169], az Sh-CIV tömege ($M_r = 20196 \pm 1$) azonban nem igazolta a korábban sejtett 20 aminosavnyi többletet az Sh-CIII-hez képest [168]. Az Sh-CII triptikus emésztése után készített MALDI-TOF tömegspektrum az MS-Fit segítségével minden kétséget kizáróan azonosítható volt (MOWSE találat: 20141) az NCBI adatbázisban (gi:6014894, $M_r=19391$), mint *Stichodactyla helianthus* St I [169]. A tripszinnel emésztett Sh-CIII (**15. ábra**, MOWSE találat: 134189, 50,9% szekvenciafedés) és Sh-CIV (MOWSE találat: $4,39 \cdot 10^6$, 50,3% szekvenciafedés) a MALDI-TOF tömegspektrumaiból a PMF egyaránt St II-t eredményezett (gi:2815496, $M_r=19283$). Ez az azonosság utalt e két izotoxin szekvenciájának nagymértékű hasonlóságára. A részleges MALDI-TOF szekvenciafedések azonban további vizsgálatokat indokoltak, amelyeket egy ioncsapdás készüléken LC-ESI-MS és MS/MS alkalmazásával végeztünk el [136].

A **16. ábra** bemutatja a tripszinnel emésztett Sh-CIV-ről készült LC-ESI-MS felvételt, szemléltetve a programozott („dinamikusnak” vagy „adatfüggőnek” is nevezett) mérési folyamatot. Ennél az eljárásnál a (például) 47,32 percnél eluált peptidről (16a. ábra) először egy teljes ESI tömegspektrumot vettünk fel (16b. ábra), amelynek legintenzívebb ionjáról ezt követően egy “zoom” felvétel készült (16c. ábra). Az utóbbi célja az ion töltésének (z) meghatározása volt, hogy a peptid tömege

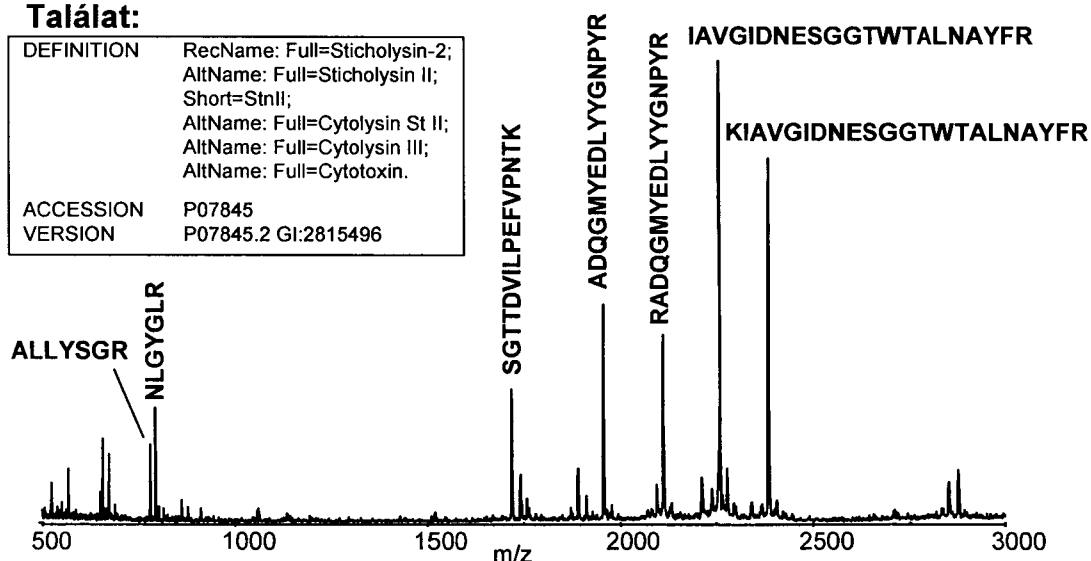


14. ábra. A *Stichodactyla helianthus* Sh-CII, Sh-CIII és SH-CIV izotoxinjairól készített ESI tömegspektrumok.



Találat:

DEFINITION	RecName: Full=Sticholysin-2; AltName: Full=Sticholysin II; Short=StnII; AltName: Full=Cytolysin St II; AltName: Full=Cytolysin III; AltName: Full=Cytotoxin.
ACCESSION	P07845
VERSION	P07845.2 GI:2815496

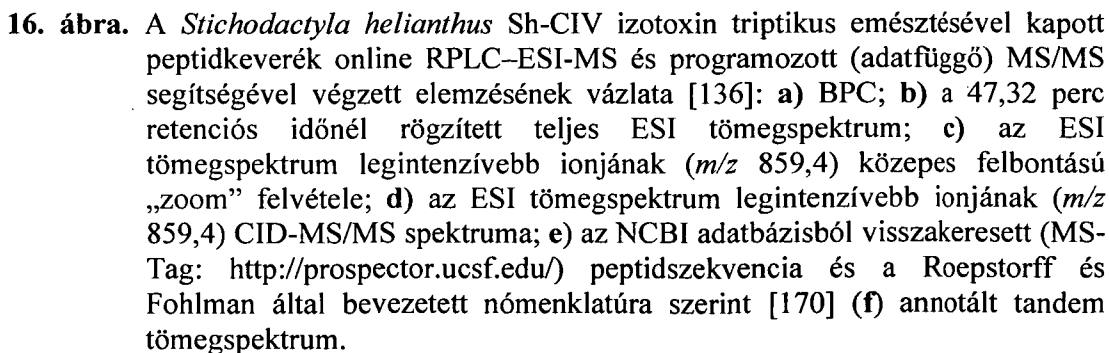


15. ábra. A *Stichodactyla helianthus* Sh-CIII izotoxin triptikus emésztése után készített MALDI-TOF tömegspektrum (α -ciano-4-hidroxifahéjsav mátrixban), és az ennek felhasználásával PMF módszerrel végzett fehérjeazonosítás [136].

a mért m/z -ből egyértelműen meghatározható legyen. A triptikus peptidek ESI tömegspektrumában általában az $[M+2H]^{2+}$ ionok a legintenzívebbek, de C-terminális, nagy molekulatömegű, a szekvenciában hisztidint (His, H) tartalmazó, a tripszinnel részlegesen hasított (azaz belső arginint, Arg, vagy lizint, Lys, tartalmazó), egyes foszforilált, stb., peptidek legintenzívebb ESI ionjai nem feltétlenül kétszeresen töltöttek. A “zoom” felvétel után az ionról, CID-t követően, egy MS/MS termékion-spektrum készült (16d. ábra). Ezzel a folyamattal a kromatogram minden csúcsáról készült tömegspektrum, beleértve “zoom” felvételeket és MS/MS spektrumokat is. Az adatokat azután a St II (NCBI, gi:2815496) teljes fehérjeszekvenciájából kiindulva kézi kiértékeléssel vagy, megfelelő számítógépes formattálás után, adatbázisból történő visszakereséssel (SEQUEST, MS-Tag, stb.) rendeltük a megfelelő peptidszekvenciákhoz (16e. ábra). Az MS/MS felvételen azonosított szekvenációkat a Roepstorff és Fohlmann [170] által meghonosított nomenklatúra szerint jelöltem (16f. ábra). Az interpretálásban figyelembe vettem, hogy CID alkalmazásakor a termékion-spektrumokban a peptidlánc C—N kötéseinek felhasadásával képződő b- és y-típusú töredékek vannak többségben [171].

A MALDI-TOF elemzéseket ESI-LC-MS és MS/MS mérésekkel kiegészítve az Sh-CIII (St II) izotoxin szekvenciájának 95%-át sikerült lefedni [136]. Számos, a MALDI-TOF tömegspektrumban nem detektált Sh-CIII triptikus peptid (például az 1–26 és a 75–118 töredék) megjelent az emésztett Sh-CIV-ről készített LC-ESI-MS felvételben is. A 17. ábra szemlélteti, hogy e két utóbbi fehérje triptikus töredékekből azonosítható szekvenciája kb. 90%-ban közös volt, és ez az azonosság nem korlátozódott az Sh-CIII szekvenciájának specifikus tartományára. Ugyan az Sh-CIV Edman degradáció segítségével feltárt N-terminális szegmensének megfelelő töredéket (DQKEQTR) MALDI-TOF és LC-ESI-MS vizsgálatokkal nem találtuk meg, a hagyományos és a tömegspektrometriás módszerek segítségével szerzett információk egymást kiegészítették és együttesen arra utaltak, hogy a kérdéses izolált fehérje egy proteolitikusan nem teljesen feldolgozott Sh-CIII (St II) izotoxin.

A citokróm c_4 fehérjék feltételezett szerepe a baktériumokban az aerob sejtlégzéshez kapcsolódik, és pozíciója valószínűleg az elektrontranszport-lánc végső oxidázához közeli helyen van [172, 173]. Egy ilyen citokróm fehérje jelenléte egy anaerob fotoszintetikus organizmusban (*Thiocapsa roseopersicina*) [174] ezt a feltételezést azonban bizonyos mértékben kétségbe vonja. A citokróm c_4 fehérje a



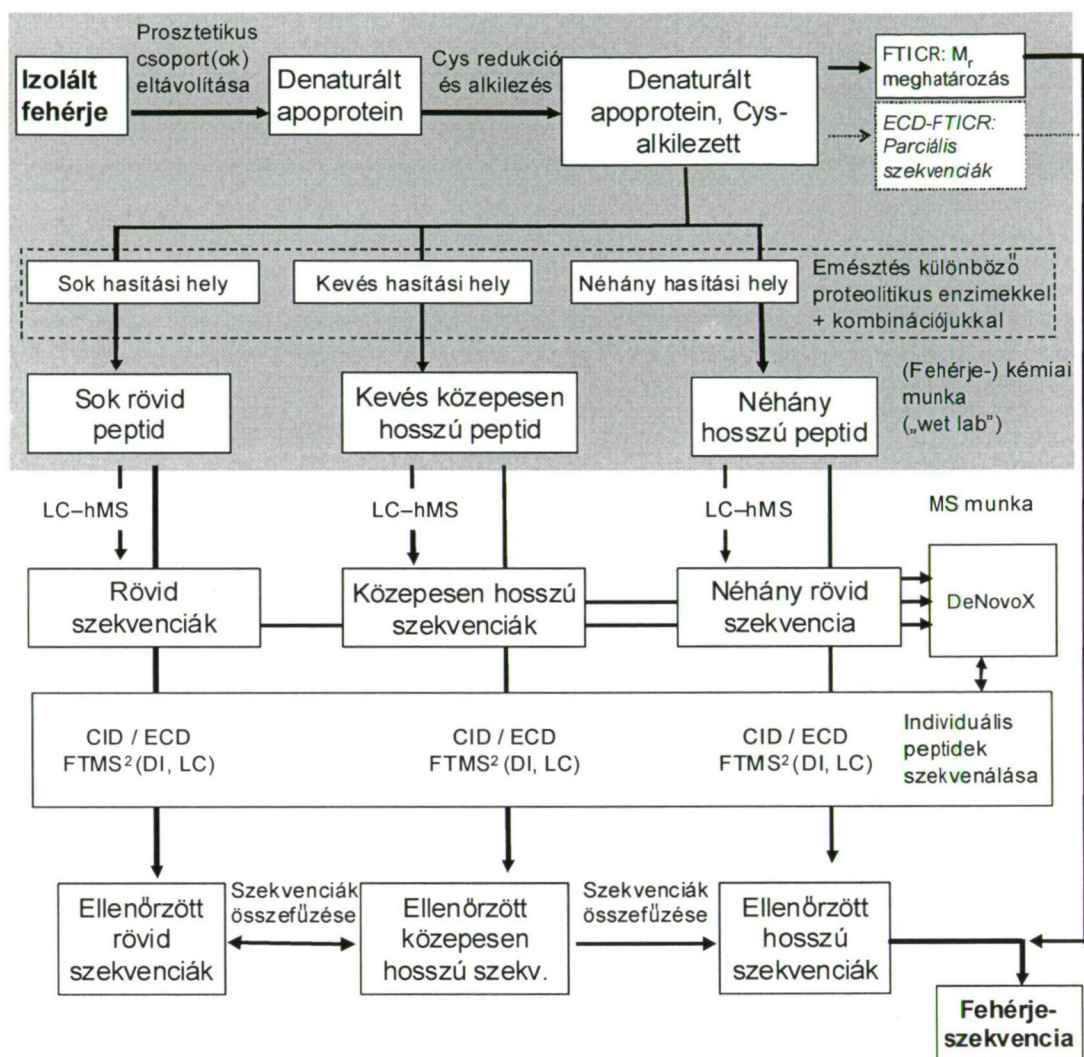
1	31	51
Sh-CIII	ALAGTIIAGA SLTFQVLDKV LEELGKVS RK IAVGIDNESG GTWTALNAYF RSGTTDVILP	
Sh-CIV (DQKEQTR)	<u>ALAGTIIAGA SLTFQVLDKV LEELGK</u>	IAVGIDNESG GTWTALNAYF <u>RSGTTDVILP</u>
61	81	101
		121
EFVPNTKALL YSGRKDTGPV ATGAVAAAFAY YMSSGNTLGV MFSVPFDYNW YSNWWDVKIY SGKRRADQGM		
<u>EFVPNTKALL YSGRKDTGPV ATGAVAAAFAY YMSSGNTLGV MFSVPFDYNW YSNWWDVK</u>		<u>ADQGM</u>
131	151	171
YEDLYYGNPY RGDNGWHEKN LGYGLRMKGI MTSAGEAKMQ IKISR		
<u>YEDLYYGNPY RGDNGWHEKN LGYGLR</u>	<u>GI</u>	<u>MTSAGEAK</u>

17. ábra. Az *Stichodactyla helianthus* Sh-CIV fehérje MALDI-TOF és online RPLC-ESI-MS és adatfüggő MS/MS módszerek segítségével azonosított peptidszekvenciák [136] az ismert Sh-CIII izotoxin Edman-degradációval meghatározott szekvenciájával [169] összehasonlítva. Az aláhúzott szekvenciákat MS-Tag (<http://prospector.ucsf.edu/>) keresőprogram segítségével az NCBI adatbázisban is megtaláltuk. Az Sh-CIV N-terminális szekvenciáját (zárójelben) részleges Edman-szekvenálással állapították meg [168].

Thiocapsa roseopersicina-ban nagy valószínűséggel a fotoszintézisben vesz részt. A már megismert tulajdonságainak figyelembevételével [174], szerepének további tisztázásához a fehérjét izolálták, kristályosították és nagyfelbontású röntgendiffrakciós felvételt készítettek róla [175]. A háromdimenziós szerkezet röntgendiffrakciós felvételből való meghatározásához és további strukturális biológiai vizsgálatokhoz a fehérje szekvenciáját ismerni kell. Mivel aminosav-szekvenciájáról nem állt rendelkezésünkre sem hagyományos Edman módszerrel meghatározott, sem génszekvencia-meghatározásból származó információ, a *Thiocapsa roseopersicina* citokróm c₄ fehérjéje egészen más (*de novo*) megközelítést igényelt, amikor a primer szerkezetet (szekvenciát) kívántuk meghatározni [149], mint az előző paragrafusokban ismertetett citolizinek. A *Thiocapsa roseopersicina* genomja még nem ismert, és a baktériumokban található citokrómok szekvenciájuk szerint rendkívül különbözőek, és ennek következtében adatbázisokon és szekvenciahomológiakon (BLAST, FASTS, MS-Homology, stb.) alapuló módszerek [176, 177] gyakorlatilag használhatatlanok voltak.

Sikeres *de novo* munkához alapvető fontosságú volt egy nagyfelbontású készülék (FTICR) alkalmazása, a rendelkezésünkre álló hibrid tömegspektrométer (lineáris ioncsapda–FTICR) pedig számos tekintetben ideálisnak bizonyult a feladat megoldására – amely megállapítás különösen igaz az online RPLC-t alkalmazó mérések esetében. “Top-down” módszeren alapuló kezdeti vizsgálataink nem voltak biztatók még csak részleges szekvenálást illetően sem, ezért a fehérje szekvencia kimerítő meghatározására “bottom-up” megközelítést alkalmaztunk. Mivel egyetlen proteolitikus enzimmel történő emésztés nem biztosít teljes szekvenciafedést és a töredékek sorrendjére utaló információt, ezért stratégiánk három eltérő hatású enzim (tripszin, Lys-C és Glu-C) felhasználására épült; sőt, emellett kettős emésztést (tripszint és utána Glu-C-t) is alkalmaztunk. Az utóbbira azért volt szükség, mert találtunk néhány viszonylag hosszú triptikus töredéket, amely MS/MS spektrumai nem tették lehetővé az peptidszekvencia egyértelmű megállapítását, illetve a megállapított szekvencia további igazolását tartottuk szükségesnek. Az alkalmazott *de novo* fehérjeszekvenálás folyamatát a **18. ábrán** foglaltam össze.

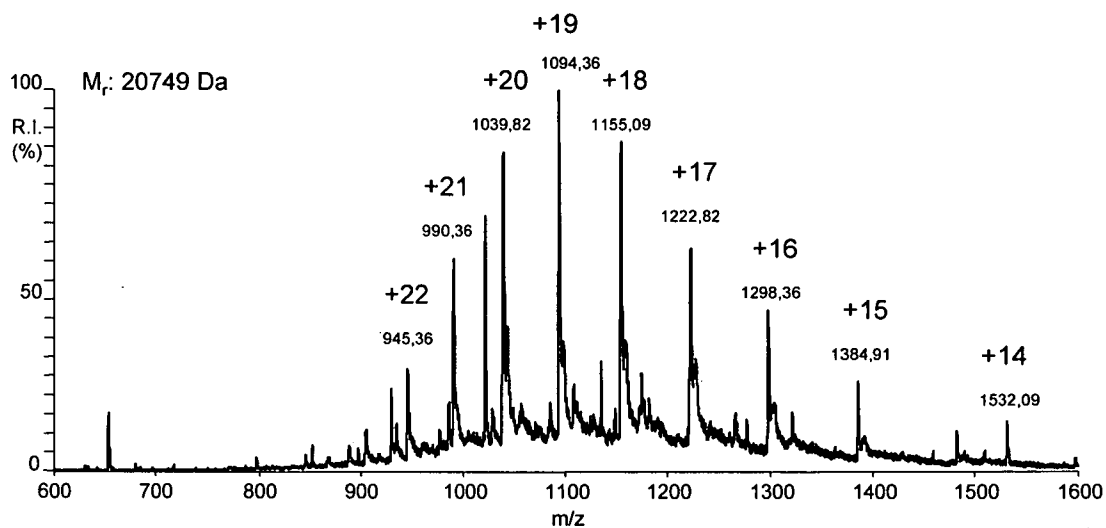
Az első fontos információ a *Thiocapsa roseopersicina* citokróm c₄ fehérje molekulatömege volt, amelyet a proszterikus csoportok (2 hem protoporfirin) HgCl₂ segítségével történt eltávolítása után 20749 Da-nak mértünk a **19. ábrán** bemutatott



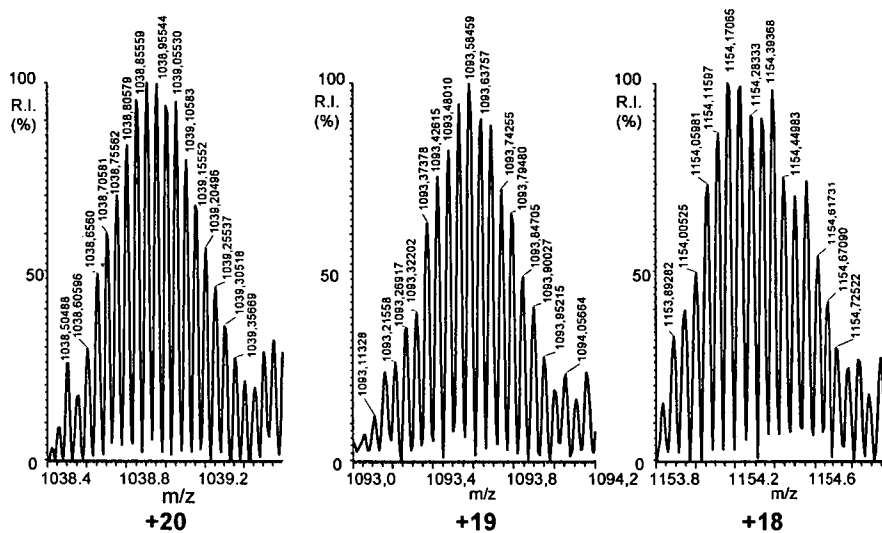
LC – Folyadékkromatográfia
 DI – Közvetlen bevétel („infúzió”)
 CID – Ütközéssel indukált disszociáció
 ECD – Elektronbefogásos disszociáció
 IT – Ioncsapda

FTICR – Fourier-transzformációs ion-ciklotron rezonancia
 FTMS² – MS/MS, iondetektálás az FTICR egységben
 ITMS² – MS/MS, iondetektálás az IT egységben
 hMS – “hibrid” MS (ESI-FTMS és adatfüggő ITMS²)

18. ábra. Az alkalmazott *de novo* fehérjeszekvenálási módszer elvi vázlata.



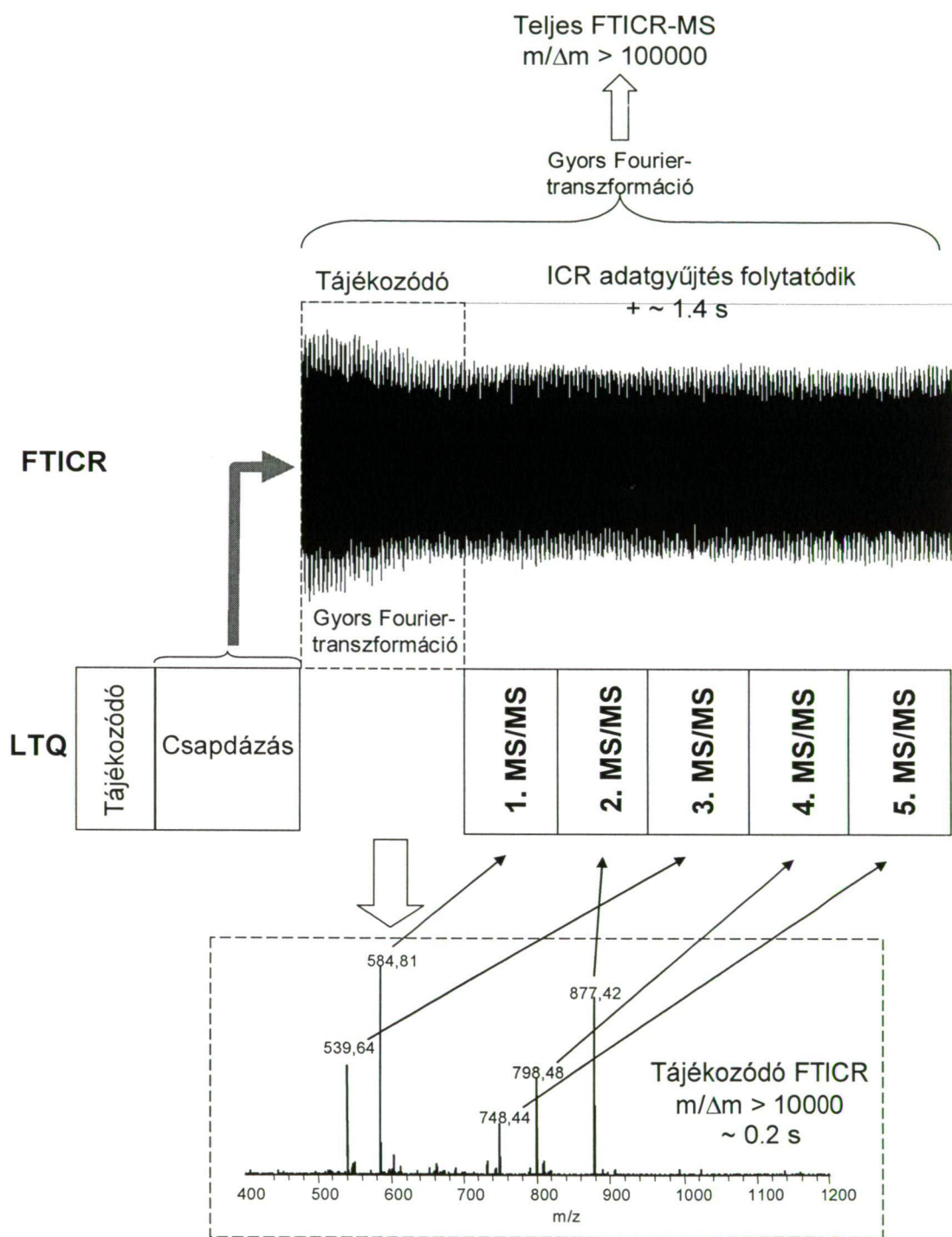
FTICR:



19. ábra. A *Thiocapsa roseopersicina* citokróm c₄ fehérje ESI tömegspektruma.

ESI tömegspektrumok alapján. Az emésztésekből származó peptidek szekvenciáját többnyire online μ -RPLC–ESI tömegspektrometriával és a 16. ábrán bemutatotthoz képest lényegesen sokoldalúbb és hatékonyabb programozott adatgyűjtéssel kapott CID-MS/MS DeNovoX szoftver [178] segítségével felvételekből határoztuk meg. A hatékonyság növekedése egy 2D (“lineáris”) ioncsapda (LTQ) – FTICR hibrid tömegspektrométer alkalmazásából adódott. Az LTQ és FTICR működését a mérések folyamán egy dinamikus program segítségével vezéreltük. Az alkalmazott hibrid készülék tervezéséből és sajátosságaiból adódóan a CID, a teljes (“full-scan”) ESI tömegspektrum FTICR felvételével gyakorlatilag párhuzamosan, az ioncsapdában megy végbe és a termékion-spektrumok (MS/MS) mérése is a készüléknek ebben az egységében történik, amikor online kromatográfiás elválasztást alkalmazunk. Az LTQ ionkapacitása mintegy 50–100-szorosa a korábban alkalmazott 3D ioncsapda (LCQ) kapacitásának. Ennek következtében nemcsak a mérések érzékenysége növekedett meg, hanem a megfelelő FTICR felbontás (általában $m/\Delta m > 100,000$, m/z 400-nál) és tömegmérési pontosság (< 2 ppm) eléréséhez szükséges kb. 1,6 másodperc alatt öt adatfüggő tandem tömegspektrumot vehettünk fel az ioncsapdában (20. ábra). Az ionok CID-MS/MS-re történő dinamikus kiválasztását, az FTICR detektálás nem “destruktív” sajátosságát kihasználva, egy gyors Fourier-transzformációval kapott tájékoztató („survey” scan, $m/\Delta m > 10,000$) tömegspektrumból végeztük közvetlenül a detektálás elindítása után (kb. 0,1 másodperccel). A programozott adatgyűjtés tehát nemcsak teljes (nagyfelbontású „full-scan”) tömegspektrumokat tartalmazó online μ -RPLC–ESI-FTICR méréseket, hanem az azokban található ionokról készült ioncsapdás CID-MS/MS felvételeket is adott.

Mivel a DeNovoX-et az ioncsapdából származó CID-MS/MS spektrumokból történő peptidszekvencia-meghatározásra tervezték [178], az izobár lizint (Lys, K $\sim 128,09497$ u) és glutamint (Gln, Q $\sim 128,05858$ u) a program nem különböztette meg. Az online μ -RPLC–ESI-FTICR adatgyűjtésből származó nagyfelbontású tömegspektrumok és pontos tömegmérés alapján a 0,03639 u különbség alapján azonban a kérdéses peptidekben a K és Q egyértelműen megkülönböztethető volt. Ez különösen azért volt érdekes, mivel a triptikus emésztés termékei között a pontos tömegmérés alapján azonosítottuk például a LSDQELAAVSQYLQGLSQ peptidet ($m_{\text{mért}} = 1948,9729$ u; $m_{\text{elméleti}} = 1948,9736$; $\Delta = -0,7$ ppm), amelynek az izobár LSDQELAAVSQYLQGLSK-tól ($m_{\text{elméleti}} = 1949,0100$ u) való egyértelmű



20. ábra. Az online kromatográfia során alkalmazott dinamikus adatgyűjtés elvi vázlata az ioncsapda (LTQ) – FTICR hibrid tömegspektrométeren.

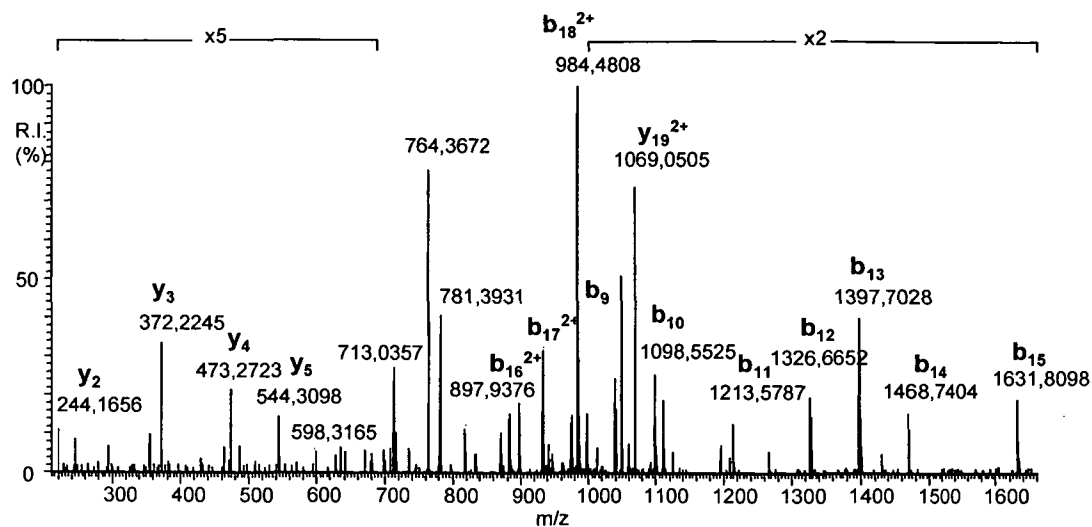
megkülönböztetéshez legalább 18,6 ppm tömegmérési pontosság (Δ) szükséges. Az FTICR mérések ezt biztosították; valószínű volt tehát, hogy LSDQELAAVSQYLQGLSQ a *Thiocapsa roseopersicina* citokróm c₄ C-terminális szekvenciája, mivel nem K, hanem Q volt a C-terminális aminosav a fehérje triptikus emésztésének e termékében. Ezt a megállapítást alátámasztotta az is, hogy a tripszin+Glu-C kettős emésztés termékei között azonosítottuk az LAAVSQYLQGLSQ peptidet. A pontos tömeginformáció számos enzimátikus (például tripszin autoproteolízisével képződő pszeudotripszin által katalizált) mellékreakció, nonspecifikus hasítás és a mintaelőkészítés során lejátszódott kémiai átalakulás (oxidáció, deamidálás, stb.) azonosításában is segítségünkre volt.

Egyes hosszabb peptidről készített ioncsapdás CID-MS/MS tömegspektrumok egyértelmű interpretálását direkt mintabevitel (azaz kromatográfiás elválasztás nélküli „infúzió”, 19. ábra) alkalmazásával és a töredékionok FTICR detektálást alkalmazó mérésekkel ellenőriztük. Ez utóbbi elősegítette, hogy a DeNovoX által lehetségesnek feltüntetett homeometrikus peptidek (amelyek egymáshoz hasonló tömegspektrumokat eredményeznek, de valójában azért különböző peptidek) közül a tényleges szekvenciát ki tudjuk választani [179].

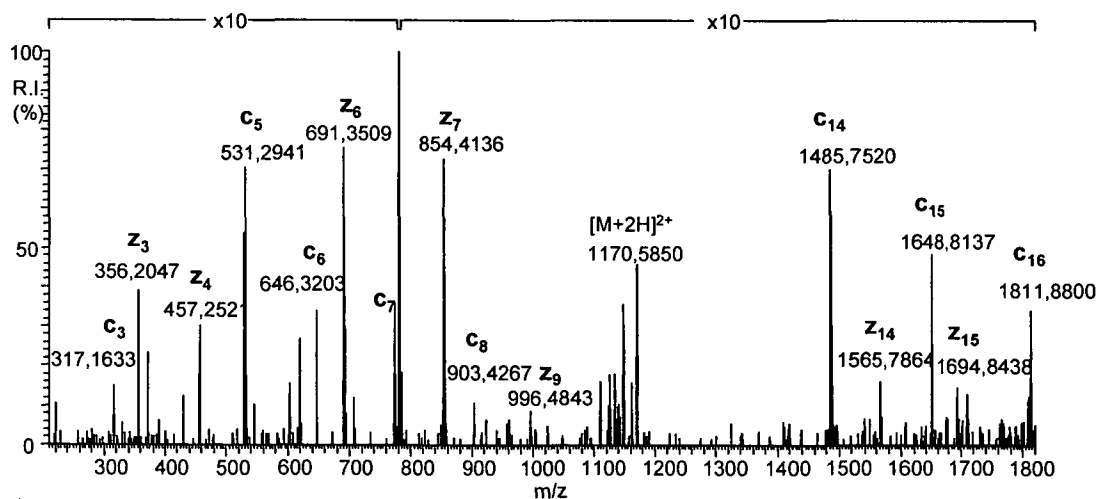
A CID nem képes egy polipeptidlánc valamennyi peptidkötését felhasítani, tehát nem ad teljes szekvenciára vonatkozó információt [180]. A *de novo* stratégiánkban ezt a hiányosságot bizonyos mértékben kiküszöbölte a több, különféle proteolitikus enzim alkalmazása, amely eredményeképpen egy adott szekvenciárészlet számos peptidben és változó (N-terminális, C-terminális és közbülső) pozíciókban fordult elő, ezért általában legalább egy MS/MS spektrumban detektálni tudtuk a kérdéses szekvenciára utaló fragmentációt. Az ECD bevezetése azonban több szempontból előnyösnek bizonyult [146], nemcsak mint alternatív, hanem mint egy CID-t kiegészítő (komplementer) disszociációs módszer is [181]. Ez abból adódik, hogy a CID során a peptidlánc C—N kötéseinek felhasadásával képződő b- és y-típusú ionokkal szemben, az ECD az N—C_α kötések disszociációját eredményezi, amelynek következtében az MS/MS spektrumokban c- és z-típusú töredékionok detektálhatók (21. ábra). Az z-típusú (gyökion) ECD töredékek másodlagos, oldalláncban lejátszódó hasadásából származó w-ionok detektálása [182] néhány esetben lehetővé tette leucin (L) és izoleucin (I) megkülönböztetését is [146].

AMPLTDQEVLDAAYYATQPK

a) CID



b) ECD



21. ábra. Az AMPLTDQEVLDAAYYATQPK triptikus peptid (4. táblázat) tandem tömegspektrumai (prekurzor ion: m/z 780,6 ~ $[M+3H]^{3+}$): a) CID-MS/MS és b) ECD-MS/MS.

A 4. táblázatban összefoglaltam a *Thiocapsa roseopersicina* citokróm c₄-ből proteolitikus emésztésekkel kapott és tömegspektrometriával meghatározott peptidszekvenciákat, amelyekből a teljes fehérje szekvencia a számos átfedésből adódóan egyértelműen felépíthető (22. ábra) [146]. A szekvenciából számított molekulatömeg ($M_r=20349$) megegyezett a mért értékkel (19. ábra), figyelembe véve a HgCl₂ segítségével végzett hem-eltávolítás során kovalensen beépült két higanyatomot ($200 \text{ u/hem} \cdot 2 \text{ hem} = +400 \text{ u}$). Munkánk bebizonyította tehát, hogy a tömegspektrometria korszerű módszerei lehetővé teszik a teljes *de novo* fehérjeszekvenálást izolált fehérjékre. A módszer alkalmazása azonban nagy szakértelmet és körültekintést igényel, ezért jelenleg még csak néhány laboratórium vállalkozik ilyen típusú feladatok megoldására. A hosszadalmas kiértékeléssel kapcsolatos feladatok elvileg programozhatók, és az eljárás „top-down” (proteolitikus emésztés alkalmazása nélküli [84]) és „middle-down” (korlátozott számú nagyméretű peptid képződését elősegítő és kihasználó [183]) stratégiák bevezetésével valószínűleg még hatékonyabbá tehető. Az általunk alkalmazott „bottom-up” módszer azonban várhatóan továbbra is szükséges lesz a meghatározott fehérje szekvencia végső ellenőrzésére vagy, amennyiben szükséges, pontosítására.

4.5. Neuroproteomika

Az idegrendszer proteomikai vizsgálatával kapcsolatos munkáim három témakörhöz kapcsolódnak leginkább. Az emlősök központi idegrendszerének fehérjekészletének feltérképezésére irányuló kutatásokhoz meghatározott szövetfrakciók komponenseinek meghatározásával járultam hozzá. Egyes gyógyszereknek bizonyos szövetfrakciók fehérjeire gyakorolt hatását a kvantitatív proteomika módszereivel vizsgáltam. A poszt-transzlációs módosulások közül az agy fehérjeire ható oxidatív stressz következtében fellépő karboniláció, ezen belül is főként az HNE-adduktok képződésével járó folyamat tömegspektrometriás módszerekkel való felderítésére fordítottam megkülönböztetett figyelmet. Az alábbi alfejezetekben, reprezentatív példákkal szemlélítve, e témakörökben végzett kutatásaimat foglalom össze.

4. táblázat: A *Thiocapsa roseopersicina* citokróm c₄-ből proteolitikus emésztéssel és tömegspektrometriával (ESI-FTICR és CID/ECD-MS/MS) meghatározott peptidszekvenciák [148].

Szekvencia	m	Δ (ppm) ^a	Tripszin + Glu-C	Tripszin	Lys-C	Glu-C
AGR	302,1702	-0,3		X		
YR	337,1753	0,9	X			
GALR	415,2546	0,7		X		
FPR	418,2332	1	X	X		
GAAAR	444,2448	0,7		X		
VLDL	458,2744	0,9	X			
QTLE	489,2441	1,2	X			
YLVK	521,3217	0,8	X			
SLYR	537,2918	1,3	X			
Q*MTPM	589,2245	0,8	X			
LSDQE	590,2556	1,4	X			
WGNPE	601,2507	1,8	X			
QMTPM	606,2513	1,3	X			
LMDFK	652,3260	0,9	X			
GESLYR	723,3548	-0,4		X		
LAGQHPE	750,3668	1,1	X			
TPGAADPE	756,3297	0,9	X			
Q*LMDFK	763,3579	0,7	X	X	X	
QLMDFK	780,3846	0,8	X	X	X	
QLM ^o DFK	796,3796	0,9	X	X		
YLQGLSQ	807,4134	0,9	X			
AN*GVCLAC	846,3375	1,3	X	X		
AMPLTDQE	903,4016	0,9	X			
Q*TLEHFR	912,4446	-0,9		X		
AM ^o PLTDQE	919,3966	1	X			
ANEQMTPM	920,3724	-0,9		X		
QTLEHFR	929,4712	-0,8		X		
QYLQGLSQ	935,4713	0,1		X		
SLVPLWPK	938,5594	0,5	X	X	X	
SLVPLW ^o PK	954,5544	0,6	X			

4. táblázat (folyt.)

Szekvencia	m	Δ (ppm) ^a	Tripszin + Glu-C	Tripszin	Lys-C	Glu-C
GAADPELASK	957,4758	-0,9		X		
LAAVSQYLQ	991,5348	1	X			
ANDPNGMMR	1004,4178	1	X	X		
ANDPDGMMR	1005,4008	0	X	X		
YLVKQLMD	1008,5308	-0,6				X
LSDQELAAVS	1031,5128	-0,7		X		
RANEQMTPM	1076,4732	-1		X		
GNSLVPLWPK	1109,6240	0,6	X	X		
SLYRWGNPE	1120,5296	-0,5				X
LAAYYATQPK	1124,5880	1,2	X	X		
LSAQHADYTK	1132,5517	0,4	X	X		
AGQHPEYLVK	1140,5902	-2,3			X	
TPGAADPELASK	1155,5762	-0,9		X	X	
LSDQELAAVSQ	1159,5716	-0,4		X		
HADYTKQTL	1204,5715	-0,7				X
AMPLTDQEVLD	1230,5816	1,1	X			
LAGQHPEYLVK	1253,6785	1,4	X	X	X	
SEGHQAAAPQVGD	1265,5640	0,3	X	X	X	X
LSDQELAAVSQY	1322,6350	-0,3		X		
LAAVSQYLQGLSQ	1376,7316	1,2	X			X
LAAVSQYLQGLSQ*	1393,7604	2,8	X			X
AN*GVCLACHGPQGN	1436,5940	1	X	X		
VLDLAAYYATQPK	1451,7667	0,5	X			
ANGVCLACHGPQGN	1453,6190	-0,1	X	X		
ADGVCLACHGPQGN	1454,6042	0,8	X	X		
VLDLAAYY*ATQPK	1467,7603	-0,4	X			
AMPLTDQEVLDLAA	1485,7376	-0,6		X		
QMTPMAMPLTDQE	1491,6398	-0,7	X			X
GHQAAAPQVGDPQAGE	1531,7029	0,9	X			
FPRLSAQHADYTK	1532,7753	1,1			X	
LSDQELAAVSQYLQ	1563,7774	-0,4		X		
CHGPQGNSLVPLWPK	1688,8450	-0,4		X		
GHQAAAPQVGDPQAGEAK	1730,8360	1,4	X			
SEGHQAAAPQVGDPQAGE	1747,7782	1,1	X			X
LAAYYATQPKTPGAADPE	1862,9035	-0,8				X

4. táblázat (folyt.)

Szekvencia	m	Δ (ppm) ^a	Tripszin + Glu-C	Tripszin	Lys-C	Glu-C
SEGHQAAAPQVGDPQAGEAK	1946,9101	1	X	X	X	
LSDQELAAVSQYLQGLSQ	1948,9729	-0,7		X		
VLDLAAYYATQPKTPGAAD	1963,9867	-1,2				X
LSDQELAAVSQYLQGLSQ ^a	1965,9997	-0,5		X		
YLVKQLMDFKAGRRANE	2038,0776	-0,3				X
TGVPACSGCHGPQGAGQSLAK	2038,9324	0,5	X			
YLVKQLM ^a DFKAGRRANE	2054,0731	0				X
VLDLAAYYATQPKTPGAADPE	2190,0826	-0,9				X
AMPLTDQEVLDLAAYYATQPK	2337,1552	-0,4		X	X	
AMPLTDQEVLDLAAYY ^a ATQPK	2353,1494	-0,7		X		
AN ^a GVCLACHGPQGNSLVPLWPK	2357,1454	1,9	X	X	X	
ANGVCLACHGPQGNSLVPLWPK	2374,1677	0,1	X	X	X	
ADGVCLACHGPQGNSLVPLWPK	2375,1547	1,4	X	X	X	
WGNPETGVPACSGCHGPAGQGQSLAK	2622,1669	-1,3		X		
HFRGALRANDPNGMMRGAAARLSDQE	2840,3666	-0,2				X
AKANGVCLACHGPQGNSLVPLWPKLAGQHPE	3305,6521	-0,9				X
AKADGVCLACHGPQGNSLVPLWPKLAGQHPE	3306,6401	0,3				X
GESLYRWGNPETGVPACSGCHGPQGAGQSLAK	3327,5157	0,2			X	
AGRRANEQMTPMAMPLTDQEVLDLAAYYATQPK	3679,7809	0,4			X	
PQAGEAKANGVCLACHGPQGNSLVPLWPKLAGQHPE	3787,8681	0,2				X
PQAGEAKADGVCLACHGPQGNSLVPLWPKLAGQHPE	3788,8521	0,2				X
TGVPACSGCHGPQGAGQSLAKFPRLSAQHADYTKQTL	4024,9241	-0,8				X
SEGHQAAAPQVGDPQAGEAKANGVCLACHGPQGNSLVPLWPKLAGQHPE	5035,4185	-0,4				X

^aTömegmeghatározás hibája: $\Delta = (m_{\text{mért}} - m_{\text{számított}}) / m_{\text{számított}} \cdot 10^6$. Kémiai módosulások: M^o=M+O; M^a=M+NH₃; M^{*}=M-NH₃+H₂O. A DeNovoX a bekeretezett kisméretű peptidekhez CID-MS/MS spektrumuk alapján kis találati értéket (score) rendelt. A program nem különböztette meg a leucint (L) és az izoleucint (I), ezért azokat a táblázatban egységesen L-lel jelöltem.

SEGHQAAAPQ VGDPOAGEAK ANGVCLACHG PQGNSLVPLW PKLAGQHPEY IVKQLMDFKA
GRRANEQMTF MAMPLTDQEV LDIAAYYATQ PKTPGAADPE LASKGESLYR WGNPETGVPA
CSGCHGPAGQ GQSLAKFPRL SAQHADYTKQ TLEHFRGALR ANDPNGMMRG AAARLSDQEI
AAVSQYLQGL SQ

22. ábra. A *Thiocapsa roseopersicina* citokróin c₄ de novo módszerrel meghatározott aminosav-szekvenciája. Az aláhúzás ECD segítségével azonosított, míg a szürke kiemelés homológia alapján (BLAST) valószínűsített leucint (L) vagy izoleucint (I) jelöl.

4.5.1. Agyból izolált szövetfrakciók fehérjekomponenseinek meghatározása

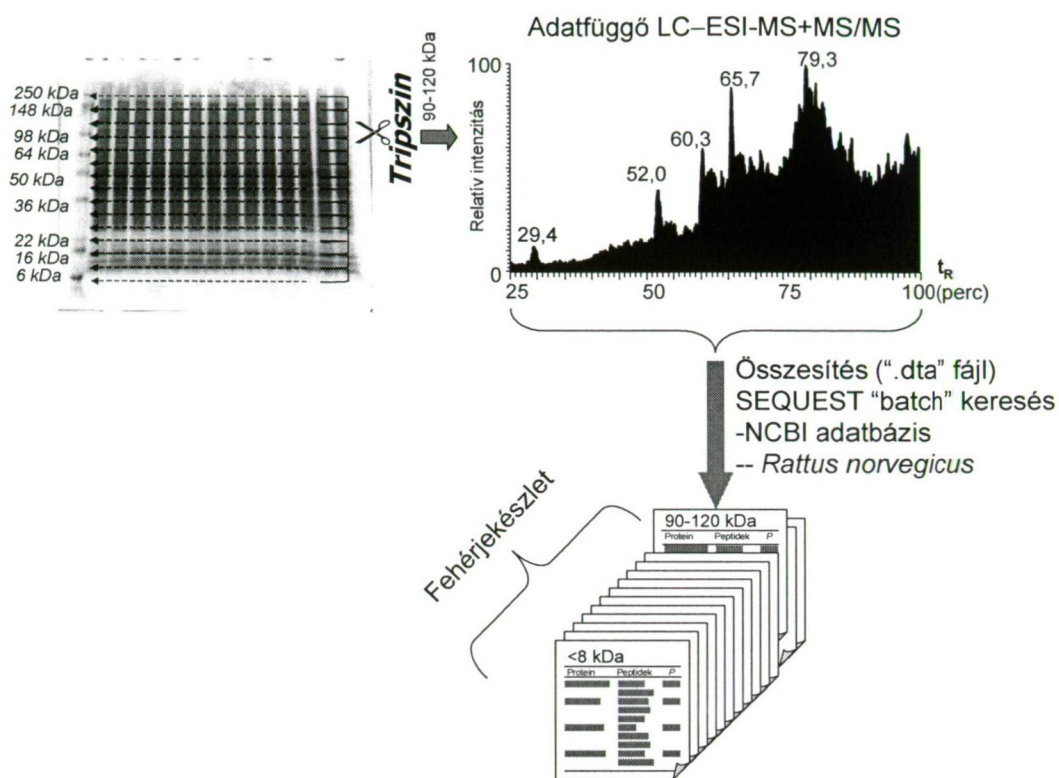
Az agy fehérjekészletének meghatározásához alkalmas módszerek kiválasztását elsőként egy szinaptikus plazmamembrán frakció felhasználásával végeztem el [137]. E frakcióval korábban a neuropeptidek metabolizmusára irányuló vizsgálatokkal értékes kísérleti tapasztalatokat szereztünk (4.2. alfejezet). A szinaptikus plazmamembrán frakció kísérleti állatok agyából megbízható biokémiai/biofizikai módszerekkel viszonylag egyszerűen (homogenizálást követő kétlépcsős szukróz gradiens centrifugálás segítségével, majd a kapott szinaptoszómák lízisével) elkülöníthető [184, 185]. Ez a frakció ideális abban a tekintetben, hogy számos, az orvosi biológiai kutatások szempontjából rendkívül fontos membránfehérjét tartalmaz. A bonyolult fehérjeösszetétel azonban indokoltá teszi a minta komplexitását csökkentő módszerek alkalmazását, mielőtt a tömegspektrometrián alapuló fehérjeazonosításokat elvégezzük. Az utóbbiak tekintetében a módszerek nem különböznek az 4.4. fejezetben ismertetettektől [136], vagyis a „bottom-up” megközelítést, a PMF-et vagy az MS/MS-t, valamint a megfelelő fehérje-adatbázisból (NCBI vagy SwissProt adatbázisok: patkány – *Rattus norvegicus*, egér – *Mus musculus*) történő visszakeresést használják.

Kezdeti vizsgálataink egyértelműen igazolták, hogy a szinaptikus plazmamembrán frakció fehérjekomponenseinek elválasztására a 2D-PAGE [100, 101] valóban csak korlátozott mértékben használható. Az „egydimenziós” SDS-PAGE kiküszöbölte ugyan a 2D-PAGE-ben első dimenzióként alkalmazott IEF hátrányait (nem alkalmas hidrofób membránfehérjékre, valamint extrém izoelektromos ponttal rendelkező és ritkább fehérjékre [101]), azonban az elért elválasztás a gélben történt emésztés és MALDI-TOF PMF felhasználásával csak a gyakori szinaptikus membránfehérjék azonosítását tette lehetővé [137]. Nagyobb mértékű szövetfrakcionálás esetén viszont az SDS-PAGE – gélben történő triptikus emésztés – MALDI-TOF – PMF módszerkombináció is eredményes volt; alkalmazásával hozzájárultunk például egy jelentős tudományos felismeréshez (az ösztrogén receptor β -izofarmájának mitokondriumokban való jelenléte) [138].

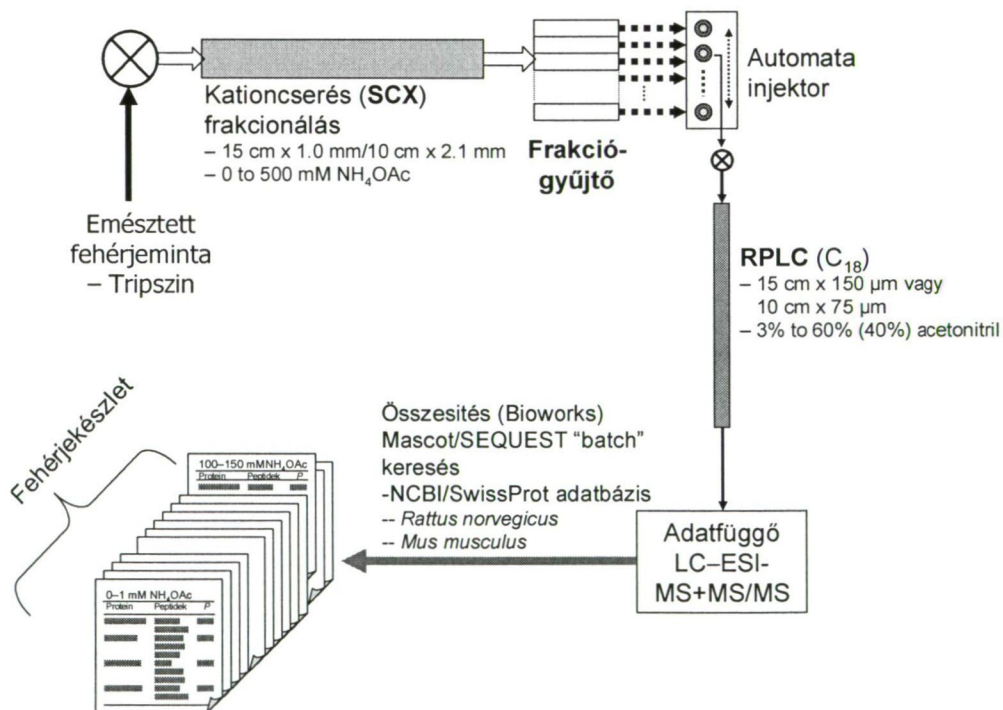
Sikeresen alkalmaztuk viszont a GeLC–MS módszert, amelyet az SDS-PAGE, a gélben történő triptikus emésztés, az RPLC–ESI-MS és az adatfüggő MS/MS kombinációjával valósítottunk meg, többnyire a **23. ábrán** bemutatott módon [41, 137]. Az ábra, példaként, a patkányagyból készített szinaptikus plazmamembrán

fehérjekészletének meghatározását szemlélteti. A minta 90–120 kDa SDS-PAGE frakciójáról gélben történt triptikus emésztés után készített nanoLC–ESI-MS ionkromatogramja (BPC) azonban arra utalt, hogy a fehérjék elektroforetikus frakcionálása nem eredményezett kromatográfiásan megfelelően szétválasztható peptidkeverékeket. Az utóbbiak viszont programozott adatgyűjtés szempontjából előnyösek lennének, mivel sok együtt eluálódó komponens esetén azok ESI ionjainak csak kis hányadáról készül MS/MS felvétel. Ez utóbbi eljárás alkalmazása természetesen csökkentheti a módszer segítségével történő fehérjekészlet-meghatározások „mélységét.” (Az azonosítható fehérjék számát tekintve a kétdimenziós GeLC-MS/MS módszer azonban természetesen lényegesen nagyobb hatékonyságú volt, mintha a szinaptikus plazmamembrán-frakció triptikus emésztése után „egydimenziós” RPLC–ESI-MS és adatfüggő MS/MS segítségével végezzük a meghatározást.) Az SDS-PAGE frakcionálás hátránya az is, hogy a módszer a kromatográfiás eljárásokhoz képest meglehetősen munkaigényes és nehezen automatizálható. Elektroforetikus módszereket a MudPIT nem vesz igénybe [118], ezért előkísérleteket végeztünk annak lehetséges bevezetésére. Az utóbbi technológia hátránya gyakorlatunkban az egyetlen nano-LC oszlopon végzett szakaszos online SCX frakcionálás viszonylag kis hatékonysága volt.

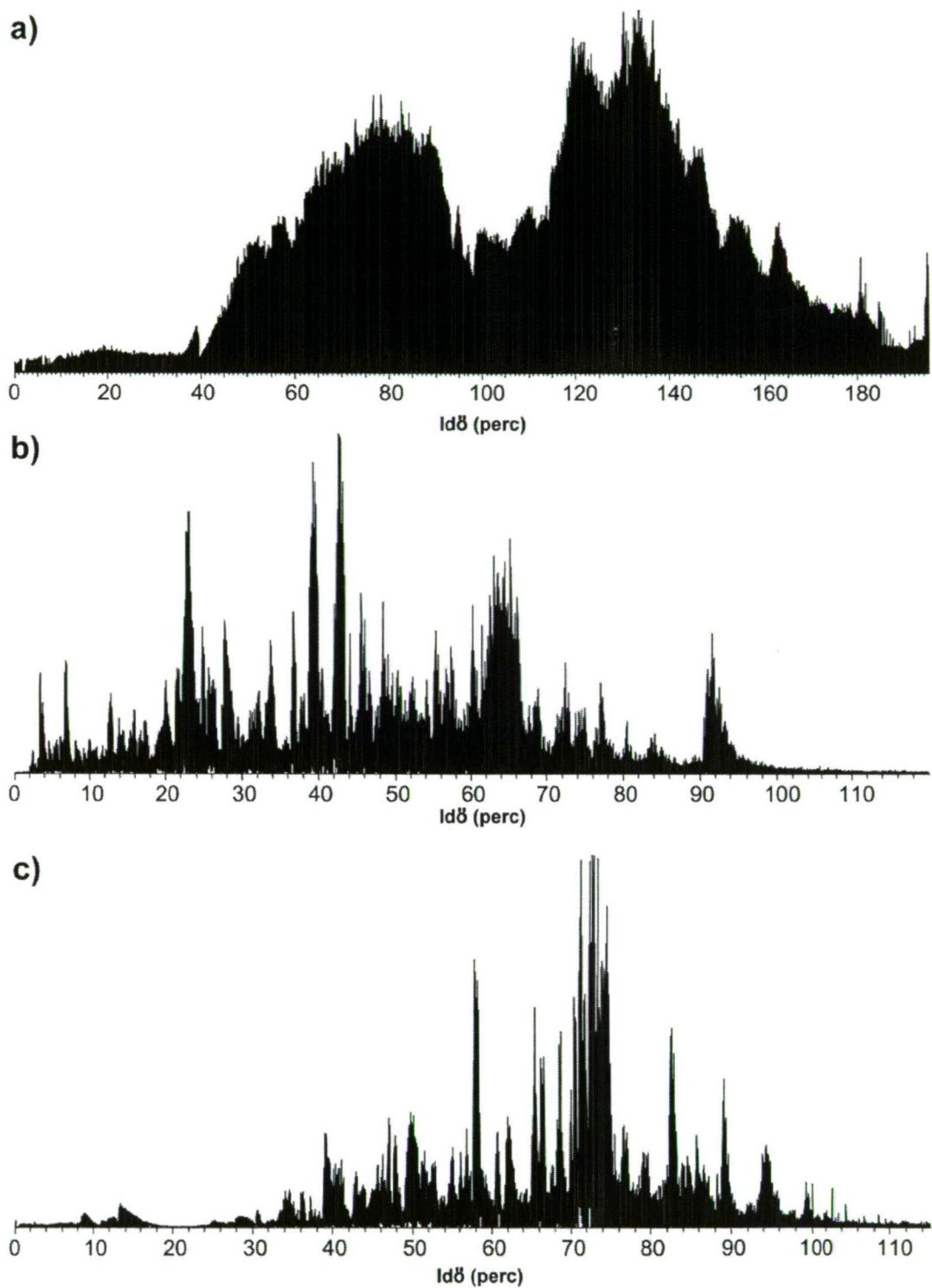
A fehérjekészlet-meghatározásokhoz leghatékonyabb kétdimenziós „shotgun” módszernek a proteolízissel emésztett minta off-line SCX frakcionálása és a frakciók ezt követő RPLC–ESI-MS és adatfüggő MS/MS elemzése bizonyult. Az eljárást a **24. ábrán** szemléltettem. A SCX frakcionálást követően készített RPLC–ESI-MS felvételek alapján megállapíthatjuk, hogy a patkányagyból készített szinaptikus plazmamembrán triptikus emésztésével kapott bonyolult peptidkeverékek komplexitása valóban számottevően csökkent (**25. ábra**) [137]. A módszer már kromatográfiásan is megfelelően szétválasztható peptidkeverékeket eredményezett (25b. és 25c. ábra), különösen igaz ez, ha az „egydimenziós” (RPLC) kromatográfiával (25a. ábra) és a GeLC–MS módszerrel (23. ábra) elért hatékonyságot vesszük alapul. Ezért a 2D-LC volt laboratóriumomban a legeredményesebb módszer szövetfrakciók fehérjekészletének meghatározására, ha az azonosított fehérjék számát vesszük figyelembe. Természetesen az utóbbi adatot nagymértékben befolyásolta az alkalmazott tömegspektrométer teljesítőképessége. Kezdetben a szinaptikus plazmamembrán-frakcióban 3D-ioncsapdával (LCQ) kapott



23. ábra. A fehérjekészlet meghatározása GeLC–MS/MS módszerrel.



24. ábra. A offline SCX frakcionálással kombinált online nano-RPLC–ESI-MS és adatfüggő MS/MS módszer vázlata.

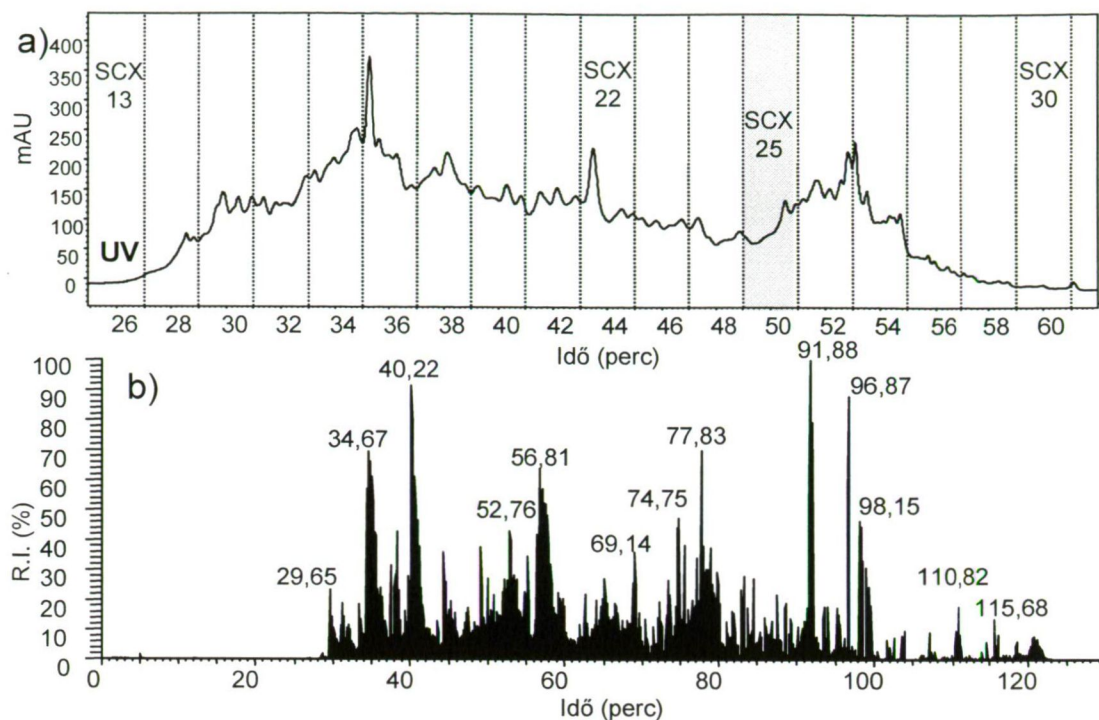


25. ábra. A patkányagy szinaptikus plazmamembrán-frakciójának proteolitikus emésztésével (tripszin) kapott összetett peptidkeverék SCX frakcionálása nélkül („egydimenziós” LC, **a**) és SCX frakcionálás után (a 22-es és a 24-es reprezentatív frakciók, **b** és **c**) kapott gradiens nano-RPLC–ESI-MS felvételek összesíon-kromatogramjainak összehasonlítása [137].

MS és MS/MS spektrumokból csak kevesebb, mint 100 fehérjét tudtunk azonosítani 2D-LC-t követően. További frakcionálással kapott úgynevezett poszt-szinaptikus denzitás frakció (amelynek fehérjei itt elhelyezkedve és együttműködve, a neurotranszmitterek által közvetített jel feldolgozásáért felelősek) fehérjekészletében már 1581 fehérjét sikerült meghatároznunk a 2D ioncsapda – FTICR (LTQ-FT) hibrid tömegspektrométerrel.

Az off-line SCX frakcionálás és online RPLC–ESI-FTICR – adatfüggő CID-MS/MS módszerek segítségével elvégeztük az egéragyból elkülönített endoplazmatikus retikulum (ER) fehérjekészletének meghatározását is (amelyet a **26. ábra** szemléltet) [143]. Az ER egy intracelluláris organelum, amely számos sejtfunkciót szabályoz [186], és az ER diszfunkciót már számos neurológiai betegséggel is kapcsolatba hozták [187]. A fehérjék folding és transzportfolyamatában ismert szerepén kívül [188] az ER részt vesz egyes biomolekulák szintézisében és tárolásában, a sejt méregtelenítő folyamataiban, valamint az intracelluláris kalcium (Ca^{2+}) tárolásában és felszabadításában is. Az idegsejtekben az ER az intracelluláris Ca^{2+} forrása, és ennek következtében olyan jelzőfolyamatokban is részt vesz, amelyeket az intracelluláris Ca^{2+} befolyásol, mint például a génexpresszió és neurotransmisszió [189]. Emlősgagyban ennek a fontos organelumnak fehérjekészletét kutatócsoportom térképezte fel először [143]. Átfogó elemzésünk 1914 fehérjét azonosított. (A napjainkban elfogadott kritériumok szerint ez azt jelenti, hogy fehérjénként legalább két peptidet találtunk MS/MS-sel és hogy a hamis pozitív azonosítás legfeljebb 0.4% volt.) A ER fehérjekészlet bioinformatikai (génontológia, GO) analízise számos biológiai folyamat jelenlétére utalt, amelyeket az **5. táblázatban** foglaltam össze. Az adatok lehetővé tették továbbá egy olyan interakciós hálózat feltérképezését is, amely az ER (mint intracelluláris Ca^{2+} -forrás) celluláris jelzőrendszerben betöltött szerepére irányítja a figyelmet (**27. ábra**).

Röviden összefoglalva, kutatásaink rávilágítottak a megfelelő hatékonyságú analitikai elválasztás fontosságára az emlősök központi idegrendszeréből elkülönített fehérjefrakciók komponenseinek tömegspektrometrián alapuló azonosításában. A kapott adatok bioinformatikai elemzésének példái megmutatták, hogy a celluláris fehérjekészletek meghatározása napjainkra már túljutott az öncélú „katalóguskészítésen”, és hogy a módszer a jövőben a neurobiológiai kutatások fontos eszközévé válhat.

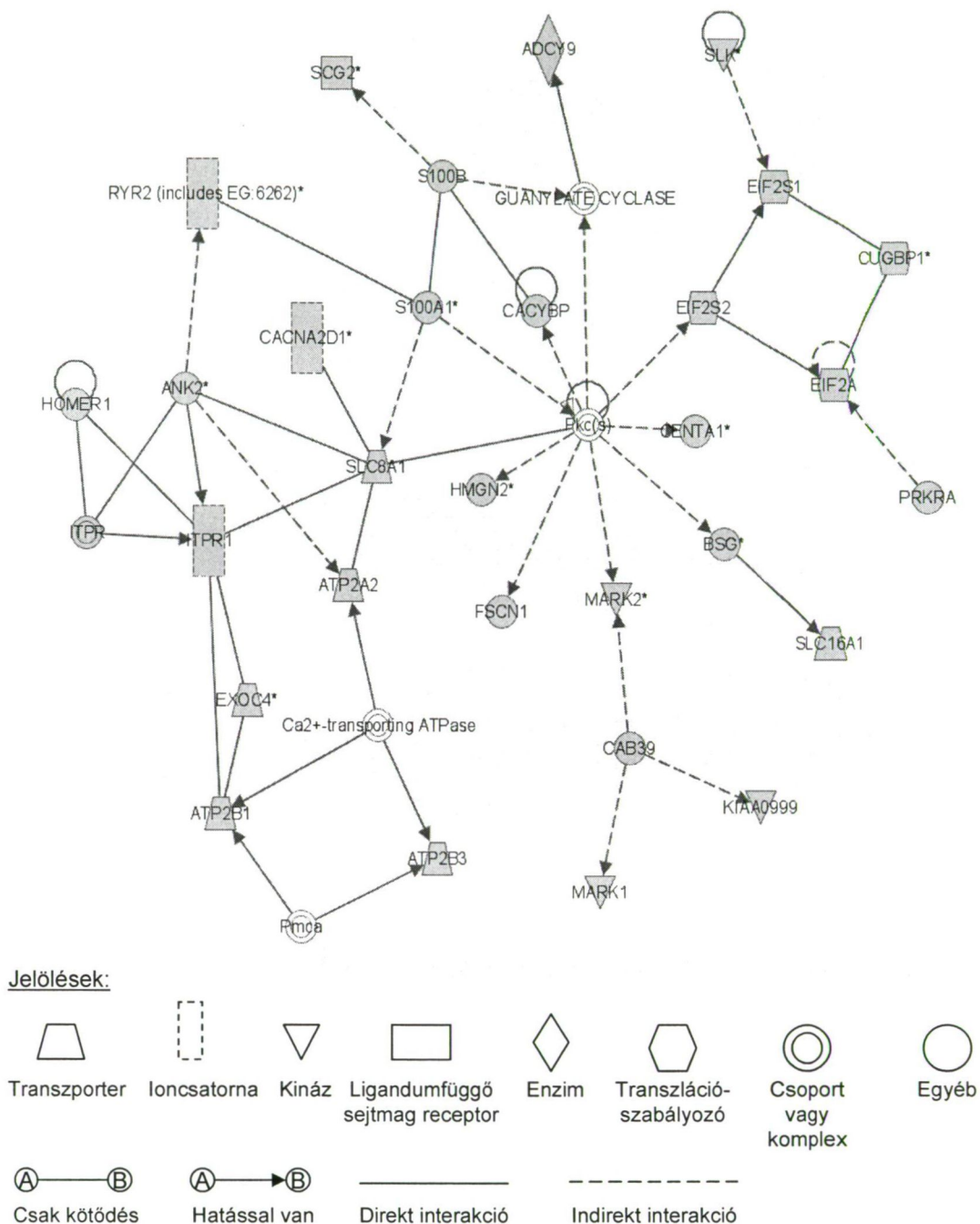


26. ábra. Az egéragyból izolált ER minta triptikus emésztésével kapott peptidkeverék **a)** offline SCX kromatográfiás frakcionálása során kapott UV kromatogram ($\lambda=280$ nm), és a **b)** 25-ös számú SCX frakcióról készített nano-RPLC–ESI-FTICR és adatfüggő CID-MS/MS felvétel összeshion-kromatogramja [143].

5. táblázat. Az egéragy ER frakciójának génontológia (GO) analízise (BiNGO program, 2.0 verzió) [143].

GO azonosító	Biológiai folyamat	Korrigált statisztikai szignifikancia	Fehérjék száma ^a
51234	Lokalizáció	$P<6,48\cdot10^{-48}$	485
16043	Sejtkomponens-szerveződés és biogenezis	$P<6,68\cdot10^{-26}$	306
51186	Kofaktor metabolizmus	$P<1,78\cdot10^{-17}$	61
6091	Metabolitprekurzor- és energia-előállítás	$P<1,89\cdot10^{-16}$	147
6119	Oxidatív foszforiláció	$P<1,32\cdot10^{-15}$	35
7267	Sejtek közötti jelátvitel	$P<1,41\cdot10^{-13}$	71
51187	Kofaktor katabolizmus	$P<8,09\cdot10^{-10}$	15
9058	Bioszintézis	$P<2,33\cdot10^{-10}$	231
9117	Nucleotid metabolizmus	$P<3,84\cdot10^{-9}$	52

^a1398 db ER fehérje közül, a biológiai folyamatok GO elnevezései szerint (GOA egérre, 38.0 verzió, az IPI adatbázis 26030 biológiai folyamatra azonosított fehérjéje alapján).



27. ábra. Az egérgy endoplazmatikus retikulum (ER) szubproteomjának bioinformatikai analizisével (Ingenuity Pathways Analysis®) feltérképezett Ca^{2+} -jelátvitellelhez és Ca^{2+} -transzportozhoz kapcsolódó interakciós hálózat [143]. A fehérjéket az NCBI Entrez adatbázisának (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) hivatalos génazonosító szimbólumaival jelöltem (például a CACNA2D1 megfelel a dihidropirimidin-érzékeny L-típusú kalcium-csatorna α -2/ δ 1-es alegységnek).

4.5.2. Kvantitatív neuroproteomika

A központi idegrendszerben bekövetkezett legtöbb perturbáció (genetikai mutáció, agysérülés, pszichiátriai és neurodegeneratív betegségek, addikció, öregedés, stb.) általában a fehérje-expresszió egy kontroll („egészséges”) állapothoz viszonyított megváltozását eredményezi. Bizonyos fehérjék koncentrációjában mérhető változások utalhatnak például a sérülés mértékére, a betegség kialakulásának okaira, az öregedést kísérő folyamatokra, stb. Mennyiségi fehérjemeghatározások segítségével tájékozódhatunk továbbá a perturbált állapot kezelésére használt gyógyszereknek és gyógyszernek szánt vegyületeknek a központi idegrendszerre gyakorolt hatásáról, beleértve a gyógyító hatás mellett az addig ki nem mutatott mellékhatásokat is.

A hagyományos immunológiai módszerek csak az alkalmazott antitest által felismert egyetlen fehérje vagy fehérjecsoport meghatározását teszik lehetővé. Proteomikai alkalmazásuk speciális technikákat igényel (antitest-chip vagy array-alapú analízisek), azonban ezeknek a fejlesztése még csak a kezdeti szakaszban van [190, 191]. A kvantitatív neuroproteomikában jelenleg a 2D-PAGE módszert használják a leggyakrabban [101], ennek az elektroforézis-alapú eljárásnak a hátrányai (különösen membránfehérjék esetében) meglehetősen jelentősek, ahogy erre dolgozatomban már többször is rámutattam. Azonban a membránfehérjék (receptorok, transzporterek és enzimek) a célpontjai a jelenleg alkalmazott gyógyszerek 70%-ának [192]. Kvantitatív neuroproteomikai vizsgálatainkat ezért, felhasználva a fehérjekészlet-meghatározások terén szerzett tapasztalatainkat [137], stabilizotópos (az úgynevezett izotópkódolt affinitáscímke, ICAT [123]) reagensekkel és LC-ESI-MS módszer segítségével végeztük (beleértve a peptidek azonosítását biztosító adatfüggő MS/MS-t is) [140]. Az ICAT-reagenseket, a mintaelőkészítéshez szükséges eszközöket és pufferoldatokat az Applied Biosystems-től (Foster City, CA, USA) szereztük be, és a kísérleteket az általuk javasolt eljárás szerint végeztük el. Az eljárás elvi vázlatát a **28. ábra** mutatja. A módszer előnye, hogy a ciszteinek (Cys, C) –SH csoportjainak ICAT-reagensekkel történő alkilálását követően a jelzett proteolitikus fragmensek a jelzetlen peptidektől affinitáskromatográfiával (a biotin hordozóhoz kötött avidinhoz való erős kötődését kihasználva, 1. „dimenzió”) elválaszthatók. Az így „leegyszerűsített” peptidkeverék nano-RPLC-vel már hatékonyan elválasztható. A differenciális („könnyű” és „nehéz”) jelölés előnye az is, hogy tömegspektrometriás elemzéssel megkülönböztethető „címkéket” ad, ezért a kezelt és kontroll minták

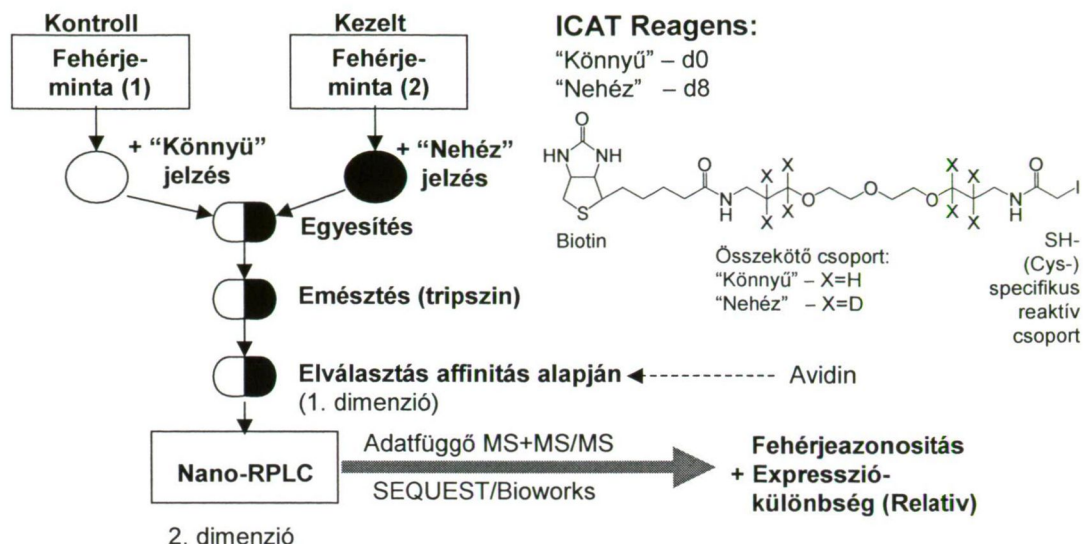
egyesíthetők. A két minta kémiai azonos de izotóp-összetételében különböző komponensei tehát gyakorlatilag együtt futnak a kromatográfiás oszlopon, és ezért a differenciálisan jelölt peptidek egyidőben detektálhatók.

A központi idegrendszer egy „perturbált” állapotának az opiát toleranciát választottam, amelyet állatkísérletekkel megfelelően tudunk modellezni a morfin szubkután ozmotikus pumpával történő folyamatos (krónikus) adagolásával [193]. A fájdalomcsillapításra az opiátok még jelenleg is a leghatásosabb gyógyszerek, működési mechanizmusuk azonban összetett, és még nem teljes mértékben tisztázott, [194]. A krónikus opiát-expozíció következtében kialakuló neuroadaptációk (tolerancia, megvonási tünetek, és a kompulzív használathoz vagy relapszációhoz hozzájáruló folyamatok) dependenciához és addikcióhoz vezethetnek [195], amelyeknek komoly patopszichológiai, pszichoszociális és társadalmi szintű következményei vannak [196]. A dependencia kialakulásában szerepet tulajdonítanak különféle szinaptikus mechanizmusoknak, de az erre vonatkozó kutatások még csak a kezdeti stádiumban vannak [195]. Az opiát-toleranciával kapcsolatos neuroproteomikai kutatásunk ezért döntően a szinapszisokra irányult.

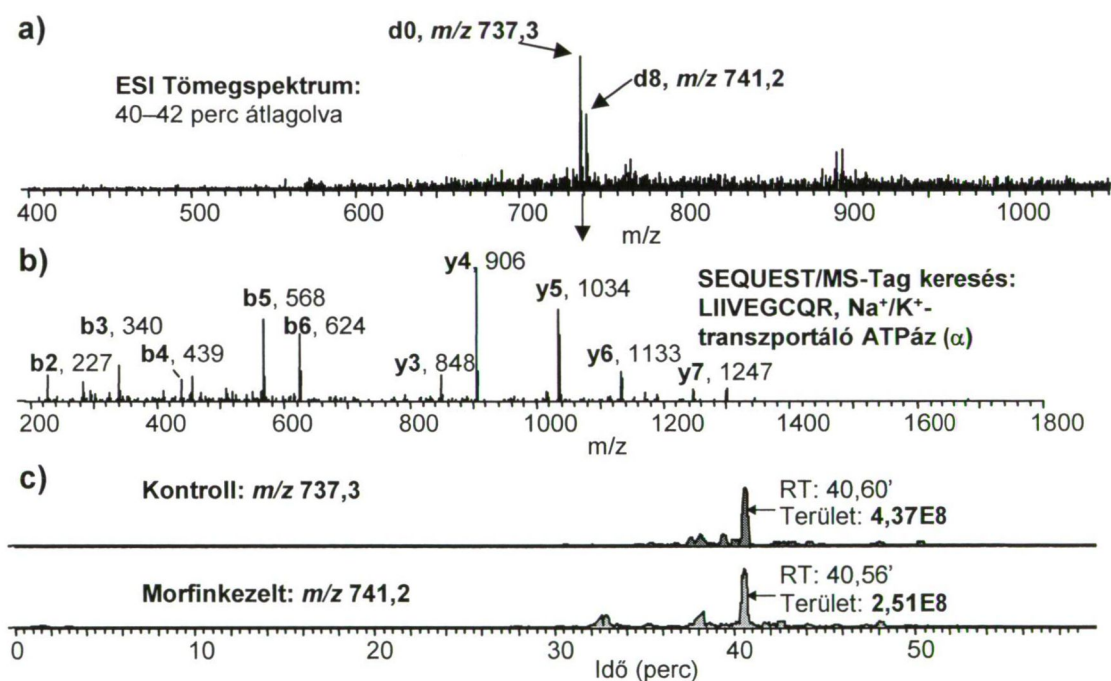
Az ICAT módszer (28. ábra), nano-RPLC–ESI-MS mérések és adatfüggő MS/MS elemzések segítségével, lehetővé tette a relatív fehérjeszintek összehasonlítását a kezeletlen és morfinkezelt állatok szinaptikus plazmamembrán-frakciójában, amelyet a 29. ábra mutat be [140]. A kromatográfiás elválasztás 40–42 perc között gyűjtött ESI tömegspektrumait átlagolva láthatóvá vált egy ICAT ionpár (m/z 737,3 és 741,2), amelyek lényeges különbségeket mutattak a kezeletlen (d0) és morfinkezelt (d8) állatok között. A 4 Th különbség jelezte, hogy ez egy kettős töltésű iontól ($[M+2H]^{2+}$) származott. A tömegspektrumokból rekonstruált, szelektált ionokat monitorozó (SIM) kromatogramok alapján a morfinkezelt állatból származó d8-ICAT-jelölt triptikus peptid mennyisége a mintában 43%-kal kevesebb volt, mint a kezeletlen állatból kapott d0-ICAT-jelölt peptidé. Az utóbbi molekulaionjának MS/MS spektruma az adatbázisban az LIIVEGC*QR triptikus peptid felelt meg, amelyben C* a d0-ICAT reagenssel alkilált Cys-t jelöli. Az LIIVEGCQR szekvencia egyértelműen az Na^+/K^+ -ATPáz α -alegységéhez (NCBI, gi: 114385) volt rendelhető. Három párhuzamos ICAT meghatározás alapján ennek az integrális membránfehérjének a mennyisége a kezeletlen állatokhoz képest a krónikusan morfinkezelt patkányok agyából származó szinaptikus membrán frakcióban $39 \pm 2\%$ -

kal csökkent. Az adatok által meghatározott szignifikancia-kritériumok alapján, átfogó elemzésünk további 16 fehérje szintjének csökkenését („downreguláció”), és 10 fehérje koncentrációjának növekedését („upreguláció”) jelezte az ópiát hatására [140]. A fehérje-expresszió megváltozásának mechanizmusai és azok biológiai hatása még nem kellően tisztázott. A Na^+/K^+ -ATPáz pumpa downregulációja azonban összefüggésbe hozható az ópiát-toleranciával. Az idegsejtekben ez a fontos membránfehérje felelős a szinaptikus membrán ionkoncentráció különbségének (és az azzal összefüggő elektromos potenciálnak) a fenntartásáért, amely lehetővé teszi az elektromos impulzusok szabályozott „propagációját” az idegsejtben és, a szinaptikus hasadékon keresztül, az idegsejtek között [197]. A Na^+/K^+ -ATPáz downregulációja az elektrogenikus Na^+/K^+ pumpálás csökkenését eredményezi, amely megmagyarázhatja az idegsejtekben az ópiátok hatására kialakuló nem specifikus (úgynevezett heterológ) toleranciát. Biser és munkatársai [198] tengerimalac modellen a vastagbél falában található mienterikus idegfonatok vizsgálatával jutottak először erre a magyarázatra, amelyet a kvantitatív neuroproteomika módszerével végzett kutatásaink tehát a központi idegrendszer szinapszissaira is igazoltak [140]. Először sikerült viszont kimutatnunk az αII -spektrin (amely az agykéreg membránjának fő citoszkeletális komponense és különösen gyakori az axonokban és a szinaptikus végződéseken [199]) szintjének csökkenését krónikus morfinexpozíció hatására, amelyet a proteolitikus enzimek (például a kaspáz-3 [200, 201]) morfin hatására bekövetkező upregulációjával hoztunk összefüggésbe [140]. Ezt a javaslatot azonban, a krónikus ópiát-expozíciót kísérő többi fehérjeexpresszió-változásokkal együtt, megfelelő neurobiológiai kísérletekkel (és gyakorlott kutatók bevonásával) még igazolni kell.

Röviden összefoglalva, a tömegspektrometrián alapuló kvantitatív neuroproteomika egy gyorsan fejlődő módszer, amely várhatóan hamarosan a neurobiológiai és neurofarmakológiai kutatásoknak integrális részévé válik [41]. Saját munkáim ezen a szakterületen jelenleg egy gyógyszerkutatási programhoz kapcsolódnak. Egyes endogén molekuláknak és az azokból származtatott vegyületeknek [163, 202] a központi idegrendszer fehérje-expressziójára való hatásának felderítésével foglalkozunk – természetesen a morfintoleranciával kapcsolatos kísérleteink [140] tapasztalatait felhasználva, és, amennyiben szükséges, hatékonyabb (vagy kísérleti technikájukban egyszerűbb és gyorsabb) módszerek bevezetésével javítva az eljárást.



28. ábra. Az ICAT módszer elvi vázlata [123].



29. ábra. Egy differenciálisan ICAT-alkilezett triptikus peptid azonosítása és a megfelelő fehérje relatív mennyiségének meghatározása kezeletlen (kontroll) és morfinkezelt patkányok agyából elkülönített szinaptikus plazmamembrán-frakciók nano-RPLC–ESI-MS és adatfüggő MS/MS elemzésével (a 28. ábrán szemléltetett kísérleti módszer alapján) [140].

4.5.3. A poszttranszlációs fehérje-karboniláció tömegspektrometriája

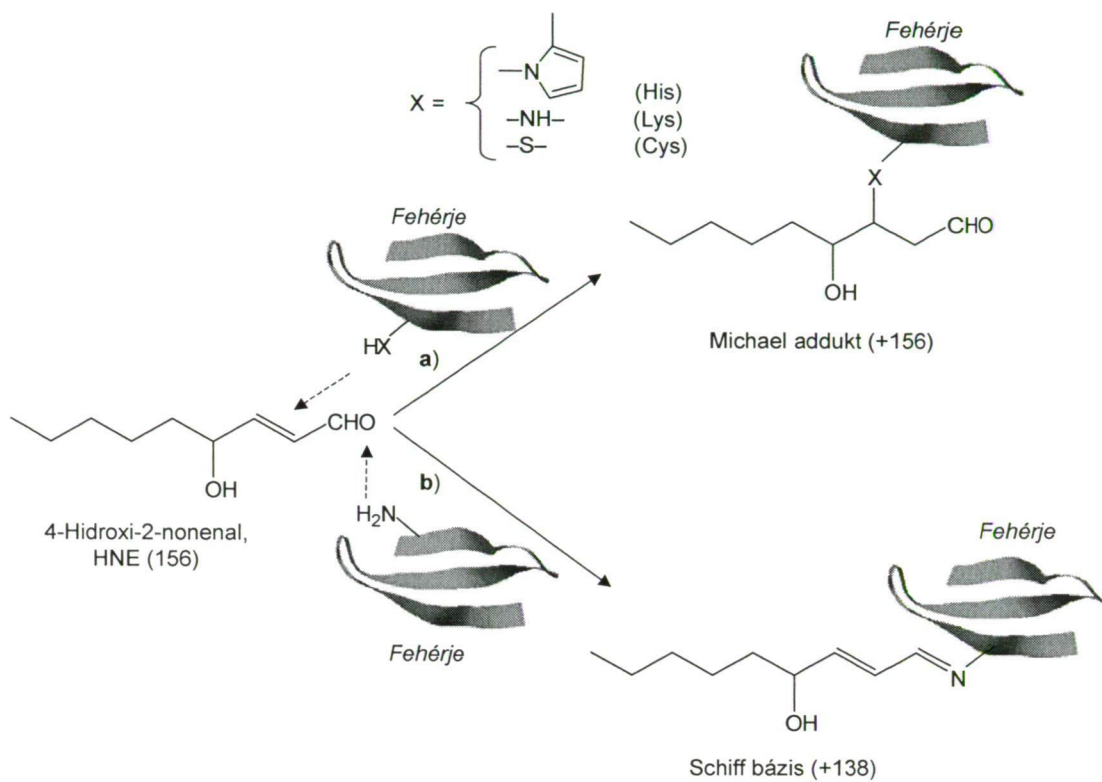
A tömegspektrometrián alapuló proteomikával legtöbbet vizsgált PTM a foszforiláció [203]. A szinaptikus plazmamembrán 2D-LC-ESI-MS/MS elemzése során kutatócsoportom is azonosított egy foszforilált triptikus peptidet (SLpSTSGESLYHVLGLDK, a szekvenciában az aminosav előtt álló p az általánosan elfogadott jelölés szerint annak foszforilációját jelöli) [137]. Ez a foszfopeptid az úgynevezett cisztein „string” fehérjéből (CSP) származott. (A Ser¹⁰ foszforilációja a CSP szinaptikus fehérje-fehérje interakcióit szabályozza, különös tekintettel a szinaptotagmin I fehérjére, amely a neurotranszmitterek exocitóziséért felelős fehérjekomplex része [204].) Egy, a Ser- és Thr-foszforiláció hatékonyabb meghatározását elősegítő módszer kidolgozásában is közreműködtem [205]. Tudományos érdeklődésem néhány éve azonban egy másik, sokkal kevésbé vizsgált és megértett PTM felé fordult.

A fehérje-karbonilációnak nevezett PTM, a foszforilációval ellentétben, valójában nem egy kémiai jól meghatározott módosulás, hanem magában foglal minden olyan folyamatot, amely a fehérjén karbonilcsoport (aldehid vagy keton) kialakulását eredményezi [106, 107]. Szabadgyökös, reaktív oxigén- és reaktív nitrogén-speciesek hatására bekövetkező vagy fémkatalizált oxidáció, és előrehaladott glikációs vagy lipid-peroxidációs végtermékeknek addíciója egyaránt fehérje-karbonilációt eredményezhet. A karbonilszármazékok felhalmozódása a sejtekben számos patofiziológiai állapottal (Alzheimer-kór, stb.) és az öregedés folyamatával kapcsolatos oxidatív stresszt is jelzi [206]. Felismerték azonban, hogy a karboniláció nem károsít minden fehérjét egyenlő mértékben [107]. A karbonilcsoportokra szelektív származékképzéssel (2,4-dinitrofenil-hidrazonok, DNPH) majd 2D-PAGE géleken a DNPH-címke immunkémiai (Western blot) módszerrel történő detektálásával az agyban számos fehérjét azonosítottak, mint az öregedéssel kapcsolatos feltételezett karbonilációs célpontot [207]. A módszer kapcsán feltételezett célpontokról azért indokolt beszélni, mivel a Western blot detektálás és az általában MALDI-TOF PMF-re alapozott fehérjeazonosítás két különböző gélből történik. A két gél fehérjéket képviselő foltjait (spots) tökéletesen átfedésbe kell hozni, és ennek a feltételnek az ellenőrzésére nincs igazán megbízható eljárás. További feltétel még az is, hogy a gélből kivágott foltban csak egyetlen fehérje legyen azonosítható, és ez sok esetben nem teljesül. A módszert ezért csak az agyi

mitokondriumok fehérje-karbonilációjának öregedéssel kapcsolatos tájékoztató vizsgálatára alkalmaztuk [139], és felismertük, hogy a célpontok megbízható azonosításához PTM-specifikus tandem tömegspektrometriás technikák szükségesek [142, 145]. A mitokondriumok termelik a sejtben a szuperoxid gyökanionok ($O_2^{\cdot-}$) és a H_2O_2 túlnyomó részét, ezért a mitokondriális fehérjék fokozottan ki vannak téve a reaktív oxigén speciek (ROS) hatásának. Megállapították továbbá azt is, hogy a mitokondriumok szerepe nagyon fontos az öregedéssel kapcsolatos oxidatív stresszre adott sejtválaszban [208]. Mivel a fehérje-karboniláció, mint PTM, sokféle folyamatot foglal magában, ezért elsőként az HNE (az egyik legismertebb lipid-peroxidációs termék) által okozott módosulásokat vizsgáltuk [107].

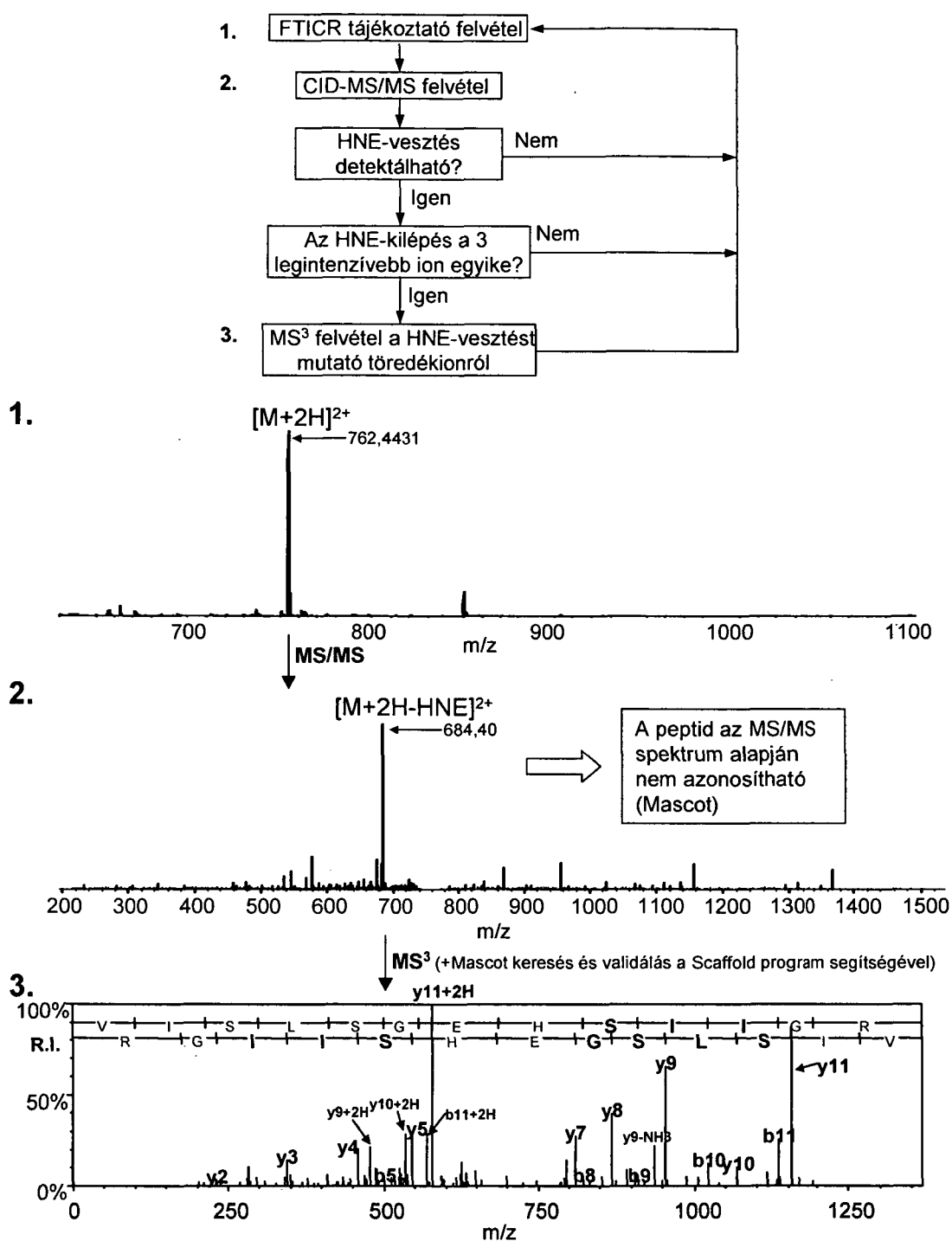
Modellfehérjék és az HNE közötti reakciók ESI-FTICR elemzései [141] igazolták, hogy kétféle termék képződésével számolhatunk (30. ábra). A His, Lys és Cys nukleofil imidazoil, ϵ -amino és sulfhidril csoportjainak a HNE kettőskötésére történő 1,4-addíciója (Michael addíció, +156 u) mellett a Lys ϵ -amino csoportja a HNE karbonilcsoportja vízkilépéssel Schiff-bázist (+138) is képezhet. A Michael-adduktok képviselik az addíciós termékek >99%-át [209]. Ellentétben a Michael-adduktokkal, a Schiff-bázisok képződése reverzibilis és valójában nem tekinthetők fehérje-karbonilációnak. Mivel a két termék között a molekulatömeg-növekedés alapján is eltérés mutatkozik, ezek tömegspektrometria segítségével megkülönböztethetők [141].

A HNE által okozott fehérje-karbonilációt egy *in vitro* modell segítségével vizsgáltuk (az előagyból előállított, túlnyomórészt mitokondriumokat tartalmazó szubcelluláris frakciót híg HNE-oldatban inkubáltuk) [142]. „Bottom-up” módszert alkalmaztunk, azaz a fehérjéket szuszpendáltuk, redukáltuk és alkileztük, majd triptikus emésztés után nano-RPLC–ESI-FTICR és adatfüggő MS/MS felvételeket készítettünk. Az utóbbiak segítségével 15 fehérjének 26 HNE-módosított triptikus peptidjét azonosítottuk, amelyek megmutatták, hogy a Michael-addíció (+156 u) volt a leggyakoribb folyamat, és a His imidazol-csoportjai voltak a reakcióban a fehérjék legérzékenyebb támadási pontjai. A tandem tömegspektrumokból azt is megállapítottuk, hogy a HNE-addukt labilis, és a CID során a lipid-peroxidációs termék sok esetben semleges molekulaként (–156 u) távozik. Megvizsgáltunk néhány MS/MS spektrumot, amely az adatbázisból történő visszakereséssel nem volt azonosítható. Felismertük, hogy ennek az volt az oka, hogy a szóban forgó tandem



30. ábra. Egy fehérje és a 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) reakciójának lehetséges termékei.

tömegspektrumokban az említett semleges molekulavesztés dominált. Ennek következtében nem jelentek meg b- és y-típusú töredékionok, amelyek az adatbázisból történő azonosítást lehetővé tették volna. Ennek kiküszöbölésére az úgynevezett semleges molekula-kilépés („neutral loss”, NL) detektálásához kapcsolt MS/MS/MS (MS^3) módszert alkalmaztuk, amely kihasználta az ioncsapdás készülék adottságait, és az adatfüggő mérések folyamatába hatékonyan beépíthető volt (31. ábra). Az NL- MS^3 azon alapul, hogy amennyiben a CID-MS/MS spektrumban megjelenik a HNE-módosulásra jellemző $[M+2H-HNE]^{2+}$ vagy $[M+3H-HNE]^{3+}$ intenzív töredékion, abban az esetben az ioncsapda ezt a töredékiont izolálja és egy újabb CID-t követően regisztrálja annak „második generációs” tandem tömegspektrumát. (Ez utóbbi valójában, a teljes FTICR spektrumot és a CID-MS/MS regisztrációját követően, a peptidről felvett harmadik tömegspektrum: ezért honosodott meg a szakirodalomban az MS^3 jelölés.) A 31. ábrán egy példával is szemléltettem a módszer működését. Míg az MS/MS spektrumban a HNE-kilépés volt meghatározó, és ezért a módosított peptid nem volt azonosítható, az MS^3 spektrumban már detektálhatók voltak b- és y-típusú töredékionok, amelyek az adatbázisból történő azonosítást lehetővé tették. Az NL- MS^3 módszerrel kiegészített nano-RPLC–ESI-FTICR és adatfüggő CID-MS/MS kb. 25%-kal növelte az agyi mitokondriumokban dúsított szubcelluláris frakcióból kimutatható HNE-adduktok számát (6. táblázat). Szubcelluláris lokalizáció szempontjából nem mindegyik azonosított fehérje volt azonban mitokondriális eredetű. Ez egyrészt annak tulajdonítható, hogy tömegspektrometriás vizsgálatok a hagyományos biokémiai/biofizikai módszereknel már sokkal érzékenyebbek, ezért kimutatják a korábban kellően tisztítottak tekintett frakciók szennyező komponenseit is. A másik indok inkább gyakorlati természetű, ugyanis a kérdéses szubcelluláris organellek nagymértékű feldúsítását csak többlépcsős eljárással érhetjük el, amelyek hozama általában nagyon csekély [210]. További, mitokondriumokra irányuló vizsgálatainkhoz ezeknek az újabb és hatékonyabb módszereknek a felhasználását már tervbe vettük. Kísérleteinkből azonosítottunk néhány olyan HNE-módosulásra érzékeny fehérjét, amelyeket már kapcsolatba hoztak az öregedéssel vagy neurodegeneratív betegségekkel. Például az akonitát hidratáz (egy fontos mitokondriális enzim) oxidatív stressz hatására végbemenő karbonilációját már *Drosophila* modellben megfigyelték [211]. A glutamát transzporter GLT1 HNE-módosulásának növekedését kimutatták amiotrófiás



31. ábra. HNE-módosított peptidok azonosítása nanoRPLC-ESI-FTICR és adatfüggő CID-MS/MS + NL-MS³ módszerrel [142]. Az ábrán példaként bemutatott tömegspektrumokat patkányagy HNE-vel kezelt mitokondrium-frakciójának elemzése során kaptuk. Az MS³ alapján azonosított peptid: VISLSGEH*SIIGR, H* a hisztidin (His) Michael-addíciós termékét jelöli (30. ábra); fehérje: szuperoxid diszmutáz (SOD1).

6. táblázat. Nano-RPLC–ESI-FTICR és adatfüggő CID-MS/MS, valamint NL-MS³ segítségével azonosított *in vitro* HNE-módosított fehérjék a patkányagy mitokondriumokban feldúsított frakciójában [142]. A peptideket és fehérjéket MS/MS és MS³ spektrumokból az International Protein Index (IPI) patkány adatbázisának (3.28-as verzió) felhasználásával a Mascot keresőalgoritmussal határoztuk meg. H* a hisztidin (His) Michael-addíciós termékét jelöli (30. ábra).

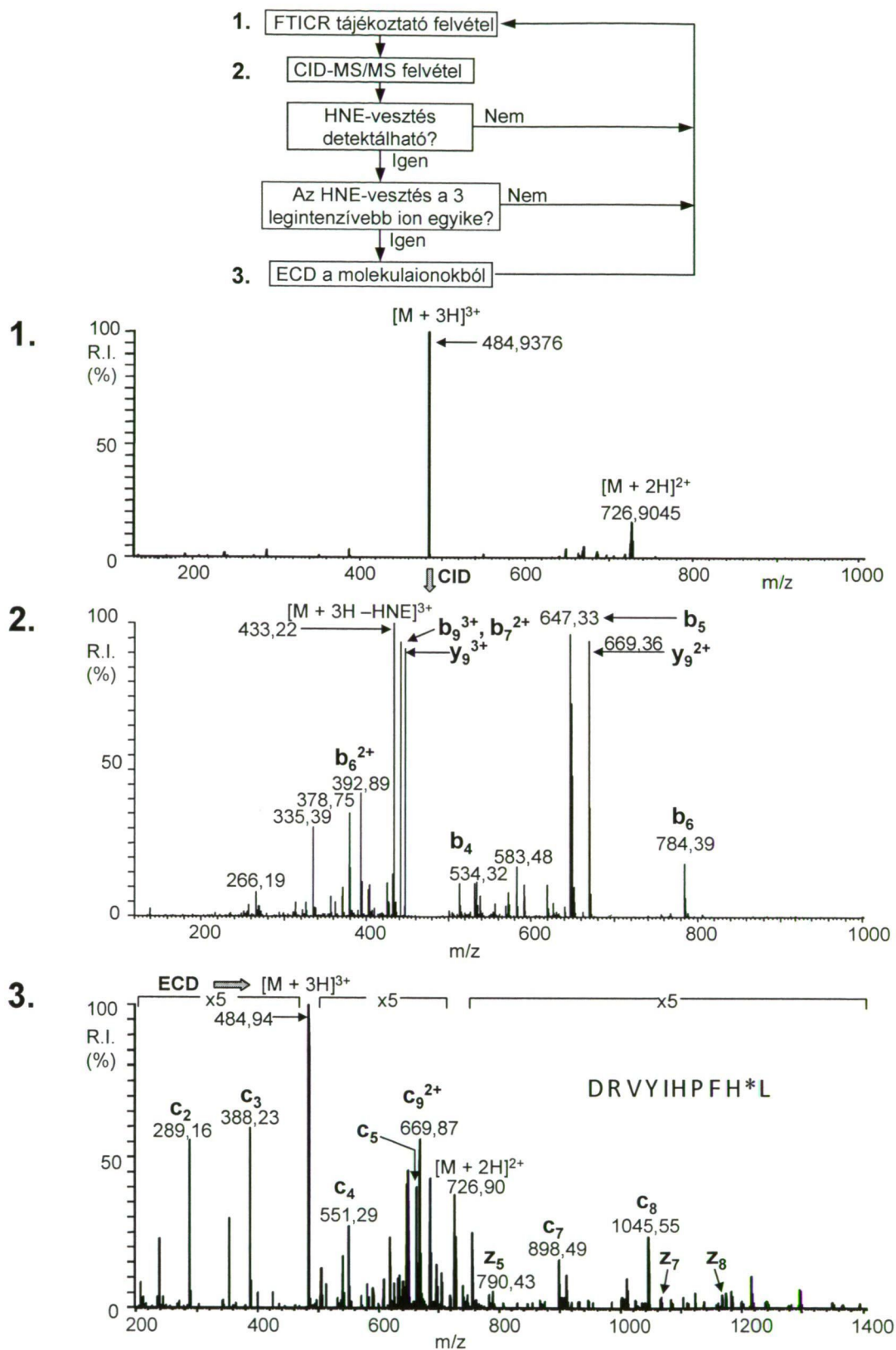
IPI azonosító szám	Fehérje	HNE-módosított peptidszekvencia	NL-MS ³ azonosítás
IPI00551812	ATP szintáz béta alegység	I(oxM)DPNIVGSEH*YDVAR LVLEVAQH*LGESTVR	
IPI00421539	Akonitát hidratáz	IVYGH*LDDPANQEIER	
IPI00373076	H ⁺ -transzportáló ATPáz V1 A alegysége (hasonló)	VGH*SELVGEIIR	+ (a)
IPI00454446	Szuperoxid diszmutáz (SOD1)	VISLSGEH*SIIGR	+ (a)
IPI00324020	Glutamin szintetáz	LTGFH*ETSNINDFSAGVANR	
IPI00213663	Glutamin transzporter 1 (izoforma)	MH*EDIEMTK SELDTIDSQH*R	+ (a)
IPI00199394	2',3'- ciklikus-nukleotid 3'-foszfodiészteráz	H*FISGDEPK	
IPI00767505	Citoplazmatikus aktin 2	H*QGVMVG(oxM)GQK VAPEEH*PVLLTEAPLNPK QEYDESGPSIVH*R	+
IPI00475639	Tubulin béta-2A lánc	GH*YTEGAELVDSVLDVVR LH*FFMPGFAPLTSR	
IPI00362927	Tubulin alfa 4	GH*YTIGK	
IPI00231451	Na ⁺ /K ⁺ - transzportáló ATPáz alfa 3 lánc	YQLSIH*ETEDPNDNR	
IPI00780645	112kD fehérje (Atp1a2)	DH*TEIVFAR	
IPI00192337	II-es Típusú kalcium/kalmodulin-függő fehérjekináz alfa lánc	SGAPSVLPH*	
IPI00209258	Spektrin alfa lánc	SQLLGSAH*EVQR	+ (a)
IPI00231819	Mielin bázikus S fehérje	YLATASTMDH*AR H*GFLPR H*RDTGILDSIGR TTH*YGSLPQK TQDENPVVH*FFK	+ + (a) +

(a) Csak az NL-MS³ módszer segítségével volt azonosítható.

laterálszklerózis-betegek gerincvelőjében [212] és Alzheimer-betegek agyában egyaránt [213]. Különösen a GLT1 karboxi-terminális régiója volt érzékeny az oxidatív stresszre [214], és a fehérje 6. táblázatban megadott két szekvenciája is ebből a régióból származik. Ezek a példák utaltak arra, hogy a tömegspektrometriás módszerrel kapott eredményeknek a biológiai vonatkozásai is megkereshetők.

A további, még részletesebb vizsgálatok elősegítésére két újabb technikát vezettünk be [145]. Az NL-MS³ módszer egyik fogyatékosága, hogy nem ad közvetlen információt a HNE-módosulás lokalizálására. Ez abból adódik, hogy az MS³ (CID) felvételekhez az $[M+2H-HNE]^{2+}$ vagy $[M+3H-HNE]^{3+}$ töredékionokat izoláljuk, tehát a módosítást az utóbbiak már nem tartalmazzák. A 6. táblázatban felsorolt triptikus peptidek esetében ez nem jelentett gondot, mert a HNE-addíció kémijából (30. ábra) minden egyes módosítás egyértelműen megállapítható volt. Előfordulhatnak azonban olyan peptidszekvenciák is, amelyekben több olyan aminosav van jelen, amely reagálhat a telítetlen aldehiddel. Erre a lehetőségre gondolva a CID-n alapuló NL-MS³-t kiegészítő technikaként vezettük be az NL-ECD-MS/MS módszert, amelyet a **32. ábrán** szemléltettem [145]. A módszerben az ECD-t az $[M+2H]^{2+}$ vagy $[M+3H]^{3+}$ ionokon hajtjuk végre, kihasználva azt a sajátságot, hogy a módosulások, ellentétben a peptidlánc N—C_α kötéseinek felhasadásához vezető folyamatokhoz, e folyamat során stabilisak maradnak [87]. Ezért a módosulás helye többnyire egyértelműen meghatározható az MS/MS spektrum c- és z-típusú ionjaiból. A modellként alkalmazott peptid (DRVYIHPFHL) két hisztidint (H) tartalmazott, ezért egy HNE molekulával való reakciójából elvileg két termék (DRVYIH*PFHL és DRVYIHPFH*L) várható. Az ECD-MS/MS felvétel egyértelműen igazolta, hogy a módosított peptid DRVYIHPFH*L volt.

A másik technika alkalmazása abból a felismerésünkből adódott, hogy a HNE-módosulások „bottom-up” tömegspektrometriás felderítésére alkalmazott dinamikus adatgyűjtési módszerek (NL-MS³ és NL-ECD-MS/MS) nem voltak kellően hatékonyak, mivel az MS/MS felvételek többsége a minta módosulást nem tartalmazó peptidjeiről készült. A módszerek hatékonyságának további növeléséhez ezért célszerűnek láttuk, más PTM (például a foszforiláció vagy glikoziláció [215]) tömegspektrometriás vizsgálatában már elterjedt eljárásokhoz hasonlóan, a módosított peptideknek az elemzéseket megelőző izolálását vagy jelentős feldúsítását. Egy nemrég kidolgozott szilárdfázisú elkülönítést [150] alkalmaztunk, amely először

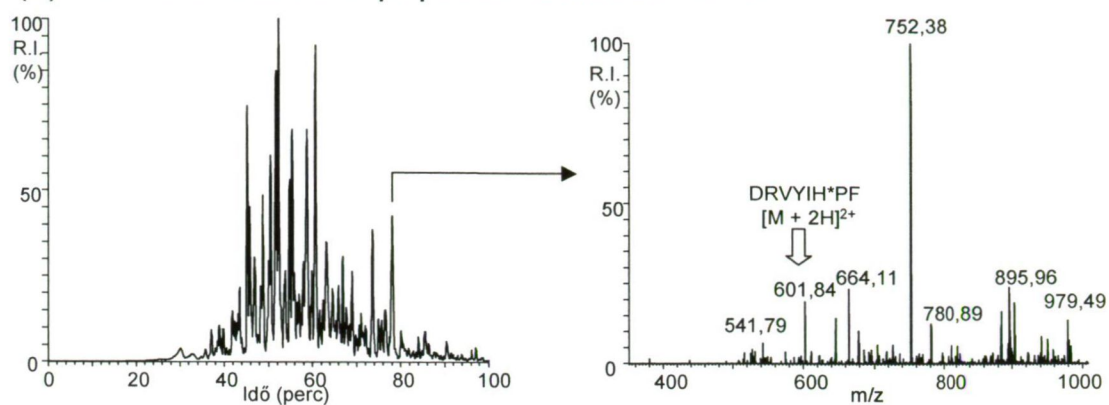


32. ábra. HNE-adduktok azonosítása online nano-RPLC-ESI-FTICR és adatfüggő CID-MS/MS + NL-ECD-MS/MS módszerrel [145].

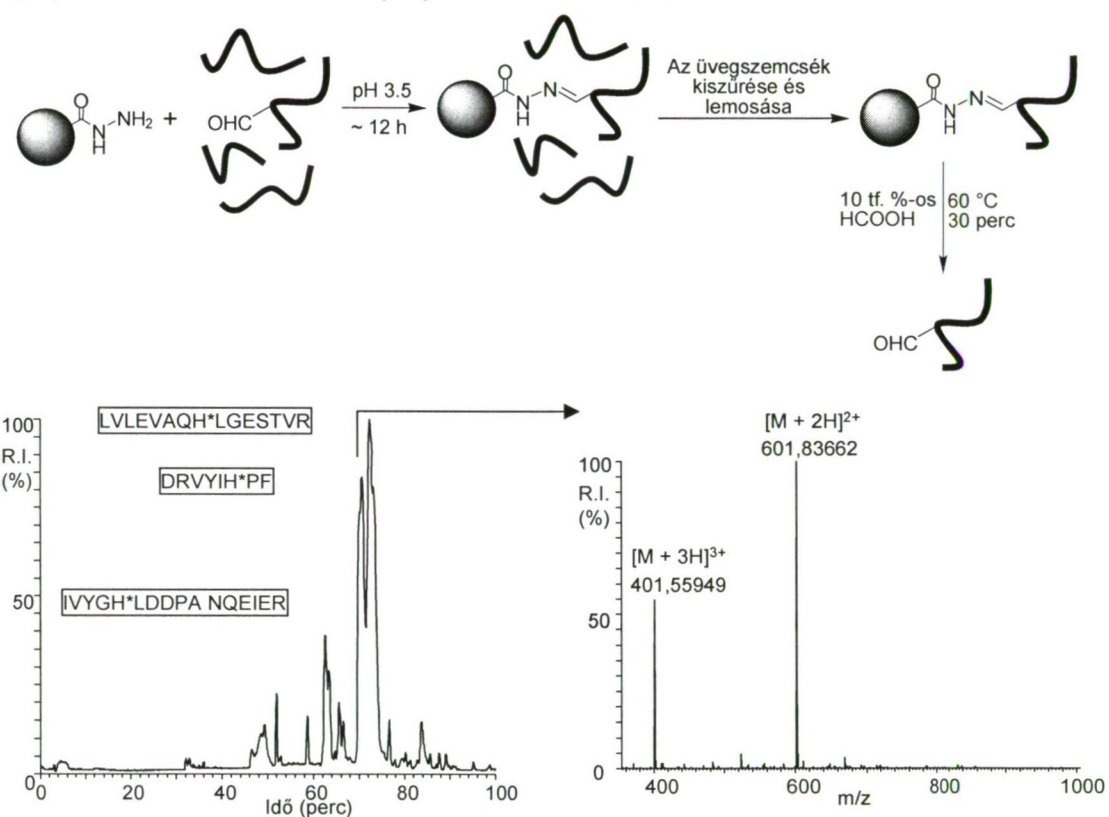
hidrazid-csoportokkal módosított felületű üvegszemcséken kémiai rögzíti az oldatminta karbonilált peptidjeit, majd az üvegszemcsék kiszűrésével és lemosásával eltávolítja a PTM-et nem tartalmazó triptikus peptideket. Az elemzéshez az üvegszemcséken reverzibilisen rögzített karbonilált peptidek hangyasav híg vizes oldatával szabadíthatók fel. Az eljárás hatékonyságát egy modellkísérlettel bizonyítottuk úgy, hogy három HNE-módosított peptidet (66 pmól DRVYIH*PF, 88 pmól LVLEVAQH*LGESTVR és 20 pmól IVYGH*LDDPANQEIER) kevertünk egérágy (100 mg) tripszinnel emésztett fehérjekivonatához [145]. További izolálás nélkül és a szilárdfázisú kémiai elkülönítés után végzett nano-RPLC-ESI-NL-MS³ elemzések eredményét a **33. ábrán** szemléltettem. Számos más triptikus peptid jelenléte miatt például a DRVYIH*PF peptid kettős töltésű molekulaionjának (m/z 601,83662) relatív intenzitása a felvett FTICR spektrumban csak kb. 20% volt abban az esetben, amikor izolálást nem alkalmaztunk (32a. ábra). Az m/z 601,83662 ion MS/MS és MS³ spektrumait adatfüggő mérésekkel a készülék mindenesetre rögzítette. Az NL-MS³ mérési folyamatból (30. ábra) azonban még 308 olyan MS³ spektrumot kaptunk, amelyek felvételét nem egy tényleges HNE-vesztés indította el [145]. Ezzel ellentétben a megfelelő FTICR felvételen gyakorlatilag csak a DRVYIH*PF molekulaionjai (kettős töltésű m/z 601,83662 és a háromszorosan töltött m/z 401,55949) voltak detektálhatók, és az elemzés során felesleges MS³ felvételek nem készültek, amikor a karbonilált peptideket előzőleg a szilárdfázisú kémiai módszerrel elkülönítettük (30b. ábra). Ezért az utóbbi eljárást a jelenleg folyó és tervezett kutatásainkban már előszeretettel alkalmazzuk.

Röviden összefoglalva, a poszttranszlációs fehérje-karboniláció felderítése körültekintő módszerfejlesztést igényel – legtöbbször a korszerű tömegspektrometria által biztosított legújabb módszerek alkalmazása is szükséges. Ez utóbbi nemcsak a fehérje-karbonilációra, hanem általában a legtöbb PTM tömegspektrometriás vizsgálatára érvényes megállapítás. Erre bizonyíték, hogy újabb módszerek és megfelelő gyakorlat birtokában számos korábbi eredmény érvényességét kellett kétségbe vonni, mivel általában nem a célnak megfelelő módszerekkel és a megfelelő szakértelem nélkül végezték a kérdéses kutatásokat [216, 217].

(a) A HNE-módosított peptidek izolálása nélkül



(b) A HNE-módosított peptidek izolálásával



33. ábra. Az agy triptikus peptidjeihez adott szintetikus DRVYIH*PF, LVLEVAQH*LGESTVR és IVYGH*LDDPANQEIER peptidek (a) izolálása nélkül és (b) azok szilárdfázisú hidrazid-kémia segítségével történt izolálásával kapott online nanoRPLC-ESI-FTICR felvételek összehasonlítása [145].

5. Összefoglalás

Dolgozatomban a makromolekulák tömegspektrometriás vizsgálata terén az elmúlt mintegy másfél évtizedben végzett interdiszciplináris kutatómunkámat foglaltam össze, kiemelve a polimerkémia, a peptidek neurobiokémiája, a szupramolekuláris kémia, a proteinkémia, a gyógyszerkutatás és a neurobiológia terén végzett vizsgálatokat. Ezek a tudományos szakterületek hatékony analitikai kémiai támogatást igényelnek, ezért fejlődésüket új vizsgálati módszerek bevezetése és alkalmazása kétségtelenül elősegíti. Az újabb tömegspektrometriás módszerek sok esetben egyedülálló előnyöket nyújtanak a makromolekulák elemzéséhez, azonban a célnak megfelelő technikák kiválasztása és kipróbálása körültekintő tudományos kutatómunkát igényel. Ehhez a tevékenységhez járultam hozzá számos szakterületen.

A szintetikus oligomerek tömegspektrometriájában, különösen a nagy polidiszperzitású makromolekulás anyagok kutatása során, a megfelelő elválasztási módszerek használata alapvető fontosságú, ezért vizsgálataimban általában az API-MS és a GPC eljárások on-line kombinációját alkalmaztam. Az ESI-MS-re alapozott molekulatömeg-specifikus detektálást kihasználva új kalibrációs eljárást vezettem be a polimer átlagos molekulatömegének és molekulatömeg-eloszlásának GPC-vel történő pontos meghatározására. A sokoldalú fejlesztéseink (FTICR és ioncsapda alkalmazása, MS/MS, stb.) eredményeként ez a módszer tekinthető napjaink műszeres polimeranalitikájában az egyik leghatékonyabb eljárásnak.

A neuropeptidek tömegspektrometriás analitikájában a biológiai alkalmazásokra helyeztem a hangsúlyt. *In vivo* mikrodialízis és LC-ESI-MS alkalmazásával igazoltuk állatkísérletekkel, hogy a kyotorfin (egy endogén dipeptid) valóban stimulálja a Met-enkefalin képződését az agy globus pallidus régiójában, amelyet előzőleg csak *in vitro* kísérletekkel tudtak kimutatni. Szubcelluláris frakcionálás és sejtkultúra felhasználásával tömegspektrometriás vizsgálatok (ESI-MS, LC-MS és MS/MS) segítségével igazoltuk, hogy (míg nagyobb dinorfinok kevésbé peptidáz-érzékenyek) a Dyn A (1-8) neuropeptidet az APN, ACE, NEP, EOP és cFPAAF-pAB-érzékeny EP enzimek gyorsan metabolizálják.

A módszer szupramolekuláris kémiai alkalmazásának példaként ESI tömegspektrometriás vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a β - és a γ -ciklodextrin alkalmasabb befogadómolekulák protonált aminosavak számára, mint az α -

ciklodextrin. Egy modell fehérjén is sikerült adduktképződést kimutatnunk, és igazoltuk, hogy a protonált aromás aminosavak alkalmasabb vendégmolekulák a DM- β -CD számára, mint a protonált alifás aminosavak. Felismertük továbbá, hogy a CID módszer használható a protonált aminosav–ciklodextrin molekulakomplexek gázfázisú stabilitásának meghatározására, és hogy a disszociáció során guest–host protonátadás történik.

Néhány izolált természetes fehérje tömegspektrometriás szekvencia-analízisét is elvégeztük. MALDI-TOF és LC-ESI-MS/MS méréseink és rokon fehérjék már korábban meghatározott szekvenciái alapján elvégzett részletes összehasonlító „bottom-up” vizsgálataink utaltak például arra, hogy egy karib-tengeri virágállatból (*Stichodactyla helianthus*) izolált de addig még részletesen nem vizsgált Sh-CIV izotoxin valójában egy, az élőlény szervezetében proteolitikusan még nem teljesen feldolgozott Sh-CIII (St II) izotoxin volt. Lényegesen nagyobb munkát igényelt egy anaerob fotoszintetizáló baktériumból (*Thiocapsa roseopersicina*) izolált citokróm c_4 fehérje szekvenálása, mivel *de novo* tömegspektrometriás módszert kellett alkalmaznunk. Vizsgálataink igazolták, hogy a feladathoz egy nagyfelbontású készülékre van szükség. A „bottom-up” szekvenálási stratégiánkban többféle proteolitikus enzim biztosította a kimerítő szekvencia-analízist, amelyet online RPLC-ESI-FTICR és adatfüggő CID-MS/MS elemzések, valamint egy *de novo* MS/MS peptidszekvenáló program alkalmazása tett elegendően hatékonyá. Az ECD bevezetése is előnyösnek bizonyult, nemcsak mint egy alternatív, hanem mint a CID-t kiegészítő disszociációs módszer.

Kutatásaink rávilágítottak arra, hogy az emlősök központi idegrendszeréből elkülönített fehérjefrakciók komponenseinek tömegspektrometrián alapuló azonosításában a megfelelő hatékonyságú analitikai elválasztás nagyon fontos. Az SCX frakcionálás és a nano-RPLC-ESI-FTICR és az adatfüggő CID-MS/MS módszerek együttes alkalmazása különösen eredményes volt. Az egéragy ER frakció általunk meghatározott fehérjeösszetételének bioinformatikai elemzése előre jelezte azt is, hogy a celluláris fehérjekészletek meghatározása a neurobiológiai kutatások fontos eszközévé válhat.

Felismertem a tömegspektrometrián alapuló kvantitatív proteomika egyedülálló előnyeit is. Az ICAT módszer alkalmazása lehetővé tette relatív fehérjeszintek összehasonlítását a kezeletlen és a morfinkezelt állatok szinaptikus plazmamembán-

frakciójában. Az eredményeink egyrészt igazoltak egyes morfintoleranciára vonatkozó korábbi kísérleti eredményeket, másrészt rávilágítottak arra, hogy lehetségesek bizonyos további neurobiológiai mechanizmusok is.

A poszttranszlációs fehérje-karboniláció vizsgálata terén végzett neurobiológiai indíttatású kutatásaink igényelték a legkörültekintőbb módszerfejlesztést. Ennek eredményeként felismertük az online kromatográfia – tandem tömegspektrometria gyakorlatában olyan eljárások alkalmazásának lehetőségét fehérjék HNE-adduktjainak azonosítására, mint a programozott (adatfüggő) NL-MS³ és NL-ECD-MS/MS módszerek. Ezek a stratégiák, a módosított fehérjék elkülönítésére kipróbált szilárdfázisú kémiai dúsítási technikával kombinálva, lehetőséget teremtenek a poszttranszlációs fehérje-karboniláció minden eddiginél átfogóbb vizsgálatára.

6. Hivatkozott szakirodalom

-
- [1] Prókai L., *J. Polymer Sci. – Polymer Lett.*, **24**, 223 (1986).
- [2] Prókai L., Simonsick Jr., W.J., *Macromolecules*, **25**, 6532 (1992).
- [3] Prókai L., *Field Desorption Mass Spectrometry*, Practical Spectroscopy Monograph Series, Marcel Dekker, New York, 1990, pp. 304.
- [4] http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/
- [5] Karas, M., Hillenkamp, F., *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988).
- [6] Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M., *Science*, **246**, 64 (1989).
- [7] Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., Alice, R.B., *J. Chem. Phys.*, **49**, 2240 (1968).
- [8] Smith, R.D., Loo, J.A., Ogorzalek-Loo, R.R., Bushman, M., Udseth, H.R., *Mass Spectrom. Rev.* **10**, 359 (1991).
- [9] Wong, S.F., Meng, C.K., Fenn, J.B., *J. Phys. Chem.*, **92**, 546 (1988).
- [10] Prókai L., *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, **6**, 379 (2001).
- [11] Prókai L., *Mass Spectrometry of Polymers* (Szerk.: Montaudo, G., Lattimer, R.P.), CRC Press, Boca Raton, 2002, 149.
- [12] Kallos, G.J., Tomalia, D.A., Hedstrand, D.M., Lewis, S., Zhou, J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5**, 383 (1991).
- [13] O'Connor, P.B., McLafferty, F.W., *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 12826 (1995).
- [14] Nielen, M.W.F., *Mass Spectrom. Rev.* **18**, 309 (1999).
- [15] Wu, K.J., Odom, R.W., *Anal. Chem.*, **70**, 456A (1998).
- [16] Yau, W.W., Kirkland, J.J., Bly, D.D., *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography*, Wiley-Interscience, New York, 1979.
- [17] Grubisic, Z., Rempp, P., Benoit, H., *J. Polymer Sci. – Polymer Lett.* **5**, 763 (1967); Újranyomtatva : *J. Polymer Sci. – Polymer Phys.* **34**, 1707 (1996).
- [18] Dondos, A., Papanagopoulos, D., *J. Polymer Sci. – Polymer Phys.* **41**, 707 (2003).
- [19] Striegel, A.M., *Anal. Chem.* **77**, 104A (2005).
- [20] Strand, F.L., *Progress in Drug Research*, 61. kötet (Szerk.: Prókai L., Prókai-Tátrai K.), Birkhäuser, Basel, 2003, 1.
- [21] Desiderio, D.M., Yamada, S., Tanzer, F.W., Horton, J., Trimble, J., *J. Chromatogr.* **217**, 437 (1981).
- [22] Desiderio, D.M., *Analysis of Neuropeptides by Liquid Chromatography and Mass Spectrometry*, Elsevier, Amsterdam, 1984, 181.
- [23] Perseo, G., Forino, R., Galantino, M., Gioia, B., Malatesta, V., Castiglione, R., *Int. J. Pept. Prot. Res.* **27**, 51 (1986).
- [24] Beranova-Giorgianni, S., Desiderio, D.M., *Methods Enzymol.* **289**, 478 (1996).

- [25] Burdick, D.J., Stults J.T., *Methods Enzymol.* **289**, 499 (1996).
- [26] Moore, W.T., *Methods Enzymol.* **289**, 520 (1996).
- [27] Nilsson, C.L., Karlsson, G., Bergquist, J., Westman, A., Ekman, R., *Peptides* **19**, 781 (1998).
- [28] Hummon, A.B., Amare, A., Sweedler, J.V., *Mass Spectrom. Rev.*, **25**, 77 (2006).
- [29] Fricker, L.D., Lim, J.Y., Pan, H., Che, F.Y., *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 327 (2006).
- [30] Zhang, X., Rauch, A., Xiao, H., Rainer, G., Logothetis, N. K., *Expert Rev. Proteomics*, **5**, 641 (2008).
- [31] Turner, A.J., Hooper, N.M., Kenny, A.J., *Neuropeptides: A Methodology* (Szerk.: Fink, G., Harmar, A.J.), Wiley and Sons, Chichester, 1989, 189.
- [32] Minamino, N., Tanaka, J., Kuwahara, H., Kihara, T., Satomi, Y., Matsubae, M., Takao, T., *J. Chromatogr. B* **792**, 33 (2003).
- [33] Svensson, M., Skold, K., Svenningsson, P., Andrén, P.E., *J. Proteome Res.*, **2**, 213 (2003).
- [34] Che, F.Y., Lim, J., Pan, H., Biswas, R., Fricker, L.D., *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1391 (2005).
- [35] Ungerstedt, U., Herrera-Marschitz, M., Jungnelius, U., Ståhle, L., Tossman, U., Zetterström, T., *Adv. Biosci.*, **37**, 219 (1982).
- [36] Bourne, J.A., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **30**, 16 (2003).
- [37] Yu, W., Cheng, Q., Feng, J., Li, F., *Pharmazie* **62**, 883 (2007).
- [38] Ungerstedt, U., Rostami, E., *Curr. Pharm. Design*, **10**, 2145 (2004).
- [39] Emmett, M.R., Andrén, P.E., Caprioli, R.M., *J. Neurosci. Meth.*, **62**, 141 (1995).
- [40] Haskins, W.E., Watson, C.J., Cellar, N.A., Powell, D.H., Kennedy, R.T., *Anal. Chem.*, **76**, 5523 (2004).
- [41] Prókai, L., *Medical Applications of Mass Spectrometry* (Szerk.: Vékey K., Telekes A., Vértés Á.), Elsevier, Amsterdam, 2008, 407.
- [42] Wild, G.C., Benzel, E.C., *Essentials of Neurochemistry*, Jones and Bartlett, Boston, 1994, 33.
- [43] Mentlein, R., Lucius R., *Brain Res. Protocols*, **1**, 237 (1997).
- [44] Sol, J.C., Roussin, A., Proto, S., Mazarguil, H., Zajac, J.M., *Peptides*, **20**, 1219 (1999).
- [45] Silberring, J., Li, Y.M., Hjertén, S., *Biochem. Soc. Trans.*, **22**, 136 (1994).
- [46] Péter A., Tóth G., Tömböly C., Laus, G., Tourwe, D., *J Chromatogr. A*, **846**, 39 (1999).
- [47] Nilsson, C.L., Brinkmalm, A., Minthon, L., Blennow, K., Ekman, R., *Peptides*, **22**, 2105 (2001).

- [48] Chappa, A.K., Cooper, J.D., Audus, K.L., Lunte, S.M., *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, **43**, 1409 (2007).
- [49] Andrén, P.E., Caprioli, R.M., *J. Mass Spectrom.*, **30**, 814 (1995).
- [50] Szejtli J., *Chem. Rev.* **98**, 1743 (1998).
- [51] Szejtli J., *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 1988.
- [52] Szejtli J., *Pure Appl. Chem.* **76**, 1825 (2004).
- [53] Stella, V.J., Rajewski, R.A., *Pharmaceut. Res.*, **14**, 556 (1997).
- [54] Ashton, P.R., Stoddart, J.F., Zarzycki, R., *Tetrahedron Lett.* **29**, 2103 (1988).
- [55] Camilleri P, Haskins NJ, New AP, Saunders MR., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **7**, 949 (1993).
- [56] Schalley, C.A., *Int. J. Mass Spectrom.* **194**, 11 (2000).
- [57] Daniel, J.M., Friess, S.D., Rajagopalan, S., Wendt, S., Zenobi, R., *Int. J. Mass Spectrom.* **216**, 1 (2002).
- [58] Lehmann, E., Salih, B., Gomez-Lopez, M., Diederich, F., Zenobi R., *Analyst* **125**, 849 (2000).
- [59] So, M.P., Wan, T.S.M., Chan, T.-W.D., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 692 (2000).
- [60] Ganem, B., Li, Y.T., Henion, J.D., *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 6294 (1991).
- [61] Lim, H.K., Hsieh, Y.L., Ganem, B., Henion, J., *J. Mass Spectrom.* **30**, 708 (1995).
- [62] Zhang, H.R., Chen, G., Wang, L., Ding, L., Tian, Y., Jin, W.Q., Zhang, H.Q., *Int. J. Mass Spectrom.*, **252**, 1 (2006).
- [63] Dotsikas, Y., Loukas, Y.L., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **14**, 1123 (2003).
- [64] Reale, S., Teixido, E., De Angelis, F., *Ann. Chim.*, **95**, 375 (2005).
- [65] Bongiorno, D., Ceraulo, L., Mele, A., Panzeri, W., Selva, A., Liveri, A.T., *J Mass Spectrom.*, **6**, 1189 (2001).
- [66] Penn, S.G., He, F., Green, M.K., Lebrilla, C.B., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8**, 244 (1997).
- [67] He, F., Ramirez, J., Garcia, B.A., Lebrilla, C.B., *Int. J. Mass Spectrom.*, **182**, 261 (1999).
- [68] Garcia, B., Ramirez, J., Wong, S., Lebrilla, C.B., *Int. J. Mass Spectrom.*, **210/211**, 215 (2001).
- [69] Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C., Watanabe, C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 5011 (1993).
- [70] Mann, M., Højrup, P., Roepstorff, P., *Biol. Mass Spectrom.*, **22**, 338 (1993).
- [71] Yates, J.R. III, Speicher, S., Griffin, P.R., Hunkapiller, T., *Anal. Biochem.*, **214**, 397 (1993).

- [72] Pappin, D.J., Hojrup, P., Bleasby, A.J., *Curr. Biol.*, **3**, 327 (1993).
- [73] <http://prospector.ucsf.edu/> — MS-Fit
- [74] Mann, M., Hendrickson, R.C., Padney, A., *Ann. Rev. Biochem.*, **70**, 437 (2001).
- [75] Wehofskey, M., Hoffmann, M., *J. Mass Spectrom.*, **37**, 223 (2002).
- [76] Krause, E; Wenschuh, H; Jungblut, PR., *Anal. Chem.* **71**, 4160 (1999).
- [77] Medzihradszky, K.F., Leffler, H., Baldwin, M.A., Burlingame, A.L., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **12**, 215 (2001).
- [78] Cunsolo, V., Foti, S., Saletti, R., Gilbert, S., Tatham, A.S., Shewry, P.R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 442 (2003).
- [79] Roepstorff, P., Schram, K.H., Andersen, J.S., Rafn, K., Baldursson, T., Kroll, J., Poulsen, K., Knudsen, J., Kristiansen, K., *Mol. Biotech.*, **4**, 1 (1995).
- [80] Medzihradszky, K.F., *Methods Enzymol.*, **402**, 209 (2005).
- [81] Adamczyk, M., Gebler, J.C., Wu, J., Yu, Z.G., *J. Immunol. Methods*, **260**, 235 (2002).
- [82] Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*, 4. kiadás, W. H. Freeman and Company, New York, 2000.
- [83] Standing, K.G., *Curr Opin Struct. Biol.*, **13**, 595 (2003).
- [84] Zubarev, R.A., Horn, D.M., Fridriksson, E.K., Kelleher, N.L., Kruger, N.A., Lewis, M.A., Carpenter, B.K., McLafferty, F.W., *Anal. Chem.*, **72**, 563 (2000).
- [85] Johnson, R.S., Biemann, K. *Biochemistry* **26**, 1209 (1987).
- [86] Horn, D.M., Zubarev, R.A., McLafferty, F.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.*, **97**, 10313 (2000).
- [87] Cooper, H.J., Håkansson, K., Marshall, A.G., *Mass Spectrom. Rev.*, **24**, 201 (2005).
- [88] Zhang, W., Krutchinsky, A.N., Chait, B.T., *J. Am Soc. Mass Spectrom.*, **14**, 1012 (2003).
- [89] Spengler, B., *J. Am Soc. Mass Spectrom.*, **15**, 703 (2004).
- [90] Pevtsov, S., Fedulova, I., Mirzaei, H., Buck, C., Zhang, X., *J. Proteome Res.*, **5**, 3018 (2006).
- [91] Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F., *Electrophoresis*, **17**, 830 (1996).
- [92] Cravatt, B.F., Simon, G.M., Yates, J.R. III, *Nature*, **450**, 991 (2007).
- [93] Aebersold, R., Mann, M., *Nature* **422**, 198 (2003).
- [94] Domon, B., Aebersold, R., *Science*, **312**, 212 (2006).
- [95] Peng, J.M., Gygi, S.P., *J. Mass Spectrom.*, **36**, 183 (2001).
- [96] Haoudi, A., Bensmail, H., *Expert Rev. Proteomics*, **3**, 333 (2006).

- [97] Preisinger, C., von Kriegsheim, A., Matallanas, D., Kolch, W., *Proteomics*, **8**, 4402 (2008).
- [98] Marcus, K., Schmidt, O., Schaefer, H., Hamacher, M., van Hall, A., Meyer, H.E., *Int. Rev. Neurobiol.*, **61**, 287 (2004).
- [99] Drabik, A., Bierczynska-Krzsik, A., Bodzon-Kulakowska, A., Suder, P., Kotlinska, J., Silberring, J., *Mass Spectrom. Rev.*, **26**, 432 (2007).
- [100] Lubec, G., Krapfenbauer, K., Fountoulakis, M., *Prog. Neurobiol.*, **69**, 193 (2003).
- [101] Beranova-Giorgianni, S., *TrAC Trends Anal. Chem.* **22**, 273 (2003).
- [102] Dreger, M., *Mass Spectrom. Rev.*, **22**, 27 (2003).
- [103] Warnock, D.E., Fahy, E., Taylor, S.W., *Mass Spectrom. Rev.*, **23**, 259 (2004).
- [104] Tribl, F., Meyer, H. E., Marcus, K., *Expert Rev. Proteomics*, **5**, 333 (2008).
- [105] Munton, R.P., Tweedie-Cullen, R., Livingstone-Zatchej, M., Weinandy, F., Waidelich, M., Longo, D., Gehrig, P., Potthast, F., Rutishauser, D., Gerrits, B., Panse, C., Schlapbach, R., Mansuy, I.M., *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 283 (2007).
- [106] Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., *Mass Spectrom. Rev.*, **24**, 55 (2005).
- [107] Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., *J. Cell. Mol. Med.*, **10**, 389 (2006).
- [108] Poppek, D., Grune, T., *Antiox. Redox Sign.*, **8**, 173 (2006).
- [109] Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 668 (2005).
- [110] Schneider, C., Porter, N.A., Brash, A.R., *J. Biol. Chem.*, **283**, 15539 (2008).
- [111] Carini, M., Aldini, G., Facino, R.M., *Mass Spectrom. Rev.*, **23**, 281 (2004).
- [112] Perluigi, M., Poon, H.F., Hensley, K., Pierce, W.M., Klein, J.B., Calabrese, V., De Marco, C., Butterfield, D.A., *Free Rad. Biol. Med.*, **38**, 960 (2005).
- [113] Reed, T., Perluigi, M., Sultana, R., Pierce, W.M., Klein, J.B., Turner, D.M., Coccia, R., Markesbery, W.R., Butterfield, D.A., *Neurobiol. Disease*, **30**, 107 (2008).
- [114] Jorge, I., Casas, E.M., Villar, M., Ortega-Perez, I., Lopez-Ferrer, D., Martinez-Ruiz, A., Carrera, M., Marina, A., Martinez, P., Serrano, H., Canas, B., Were, F., Gallardo, J.M., Lamas, S., Redondo, J.M., Garcia-Dorado, D., Vazquez, J., *J. Mass Spectrom.*, **42**, 1391 (2007).
- [115] Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T., Mann, M., *Nature* **379**, 466 (2002).
- [116] Park, Y.M., Kim, J.Y., Kwon, K.H., Lee, S.K., Kim, Y.H., Kim, S.Y., Park, G.W., Lee, J.H., Lee, B., Yoo, J.S., *Proteomics*, **6**, 4978 (2006).

- [117] Davis, M.T., Beierle, J., Bures, E.T., McGinley, M.D., Mort, J., Robinson, J.H., Spahr, C.S., Yu, W., Luethy, R., Patterson, S.D., *J. Chromatogr. B*, **752**, 281 (2001).
- [118] Wolters, D.A., Washburn, M.P., Yates, J.R. III, *Anal. Chem.*, **73**, 5683 (2001).
- [119] MacCoss, M.J., Mathews, D.E., *Anal. Chem.*, **77**, 294 A (2005).
- [120] Wu, C.C., MacCoss, M.J., Howell, K.E., Mathews, D.E., Yates, J.R. III, *Anal. Chem.*, **76**, 4951 (2004).
- [121] Beynon, R.J., Pratt J.M., *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 857 (2005).
- [122] Yao, X.D., Freas, A., Ramirez, J., Demirev, P.A., Fenselau, C., *Anal. Chem.*, **73**, 2836 (2001).
- [123] Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., Aebersold, R., *Nat. Biotech.*, **17**, 994 (1999).
- [124] Iliuk, A., Galan, J., Tao, W.A., *Anal. Bioanal. Chem.*, **393**, 503 (2009).
- [125] Prókai L., Simonsick Jr., W.J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **7**, 853-856 (1993).
- [126] Simonsick Jr., W.J., Prókai L., *Hyphenated Techniques in Polymer Characterization* (Szerk.: Provder, T., Barth, H., Urban, M.W.) fejezete, ACS Books, Washington, D.C., 1995, 41.
- [127] Aaserud, D.J., Prókai L., W. J. Simonsick, Jr., *Anal. Chem.*, **71**, 4793-4799 (1999).
- [128] Prókai L., Aaserud, D., Simonsick Jr., W.J., *J. Chromatogr. A*, **825**, 121 (1999).
- [129] Prókai L., Stevens Jr., S.M., Simonsick Jr., W.J., *Multiple Detection in Size-Exclusion Chromatography* (Szerk.: A.M. Striegel), ACS Books, Washington, DC, 2005, 196.
- [130] Ösapay Gy., Prókai L., Kim, H.-S., Medzihradszky K.F., Coy, D.H., Liapakis, G., Reisine, T., Melacini, G., Zhu, Q., Wang, S. H.-H., Mattern, R.H., Goodman, M., *J. Med. Chem.*, **40**, 2241 (1997).
- [131] Prókai L., Kim, H.-S., Zharikova, A., Roboz, J., Ma, L., Deng, L., Simonsick, W.J., Jr., *J. Chromatogr. A*, **800**, 59 (1998).
- [132] Prókai L., Zharikova, A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 1796 (1998).
- [133] Zharikova, A.D., Zharikov, S., Block, E., Prókai L., *Endothelium*, **9**, 37 (2002).
- [134] Ramanathan, R., Prókai L., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **6**, 866 (1995).
- [135] Prókai L., Ramanathan, R., Nawrocki, J., Eyler, J., *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn.*, **25**, 117 (1996).
- [136] Stevens Jr., S.M., Kem, W.R., Prókai L., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 2094 (2002).
- [137] Stevens Jr., S.M., Zharikova, A.D., Prókai L., *Mol. Brain Res.*, **117**, 116 (2003).

- [138] Yang, S., Liu, R., Perez, E., Wen, Y., Stevens Jr., S.M., Valencia, T., Brun-Zinkernagel, A.-M., Prókai L., Will, Y., Dykens, J., Koulen, P., Simpkins, J.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 4130 (2004).
- [139] Prókai L., Yan, L.-J., Vera-Serrano, J.L., Stevens Jr., S.M., Forster, M.J., *J. Mass Spectrom.*, **42**, 1583 (2007).
- [140] Prókai L., Zharikova, A.D., Stevens Jr., S.M., *J. Mass Spectrom.*, **40**, 169 (2005).
- [141] Rauniyar, N., Stevens Jr., S.M., Prókai L., *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 1421 (2007).
- [142] Stevens Jr., S.M., Rauniyar, N., Prókai L., *J. Mass Spectrom.*, **42**, 1599 (2007).
- [143] Stevens Jr., S.M., Duncan, R.S., Koulen, P., Prókai L., *J. Proteome Res.*, **7**, 1046 (2008).
- [144] Stevens Jr., S.M., Prókai-Tátrai K., Prókai L., *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 2442 (2008).
- [145] Rauniyar, N., Stevens Jr., S.M., Prókai-Tátrai K., Prókai L., *Anal. Chem.*, **81**, 782 (2009).
- [146] Branca, R.M.M., Bodó G., Bagyinka Cs., Prókai L., *J. Mass Spectrom.*, **42**, 1569 (2007).
- [147] Janowicz, A. H., Melby, L. R., U.S. Patent 4,680,352, 1987.
- [148] Kem, W.R., Dunn, B.M., *Toxicon*, **26**, 997 (1988).
- [149] Branca, R.M.M., Bodó G., Várkonyi Zs., Debreczeny M., Ösz J, Bagyinka Cs., *Arch. Biochem. Biophys.*, **467**, 174 (2007).
- [150] Roe, M.R., Xie, H., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., *Anal. Chem.*, **79**, 3747 (2007).
- [151] Montaudo, G., Montaudo, M.S., Puglisi, C., Samperi, F., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **9**, 1158 (1995).
- [152] Nielen M.W.F., *Rapid Commun Mass Spetrom.*, **10**, 1652 (1996).
- [153] Sandra, P., Vanhoenaker, G., Lynen, F., Schelfaut, M., *LC-GC Europe (Suppl.)*, **2** (December 2001).
- [154] Shi, S. D-H., Hendrickson, C.L., Marshall, A.G., Simonsick, W.J., Jr., *Anal. Chem.*, **70**, 3220 (1998).
- [155] P. Kilz, R.-P. Krüger, H. Much, G. Schulz, *Hyphenated Techniques in Polymer Characterization* (Szerk.: Provder, T., Barth, H., Urban, M.W.) fejezete, ACS Books, Washington, D.C., 1995, 223.
- [156] Hunt, S.M., Binns, M.R., Sheil, M.M., *J. Appl. Polymer Sci.* **56**, 1589 (1995).
- [157] Takagi, H., Shiomi, H., Ueda, H., Amano, H., *Nature* **282**, 410 (1979).
- [158] Chen, P., Bodor, N., Wu, W.-M., Prókai L., *J. Med. Chem.*, **41**, 3773 (1998).
- [159] Begley, D.J., Brightman, M.W., *Peptide Transport and Delivery Into the Central Nervous System, Progress in Drug Research*, 61. Kötet (Szerk.: Prókai L., Prókai-Tátrai K.) fejezete, Birkhäuser, Basel, 2003, 39.

- [160]Prókai L., Zharikova, A., Janáky T., Li, X., Braddy, A.C., Perjési P., Matveeva, L., Powell, D.H., Prókai-Tátrai K., *J. Mass Spectrom.*, **36**, 1211 (2001).
- [161]Prókai L., Prókai-Tátrai K., Zharikova, A., Li, X., Rocca, J.R., *J. Med. Chem.*, **44**, 1623 (2001).
- [162]Prókai-Tátrai K., Nguyen, V., Zharikova, A.D., Braddy, A.C., Stevens Jr., S.M., Prókai L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 1011 (2003).
- [163]Prókai L., Prókai-Tátrai K., Perjési P., Zharikova, A.D., Perez, E., Liu, R., Simpkins, J.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 11741 (2003).
- [164]Prókai L., Prókai-Tátrai K., Zharikova, A.D., Nguyen, V., Stevens Jr., S.M., *J. Med. Chem.*, **47**, 6025 (2004).
- [165]Prókai-Tátrai K., Teixido, M., Nguyen, V., Zharikova, A.D., Prókai L., *Med. Chem.*, **1**, 141 (2005).
- [166]Bongiorno, D., Ceraulo, L., Mele, A., Panzeri, W., Selva, A., Liveri, A.T., *J. Mass Spectrom.*, **6**, 1189 (2001).
- [167]Bernheimer, A.W., Avigad, L.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 467 (1976).
- [168]Kem, W.R., Dunn, B.M., *Toxicon*, **26**, 997 (1988).
- [169]Lanio, M.E., Morera, V., Alvarez, C., Tejuca, M., Gomez, T., Pazos, F., Besada, V., Martínez, D., Huerta, V., Padron, G., Chavez, M.A., *Toxicon*, **39**, 187 (2001).
- [170]Roepstorff, P., Fohlmann, J., *Biomed. Mass Spectrom.*, **11**, 601 (1984).
- [171]Slenc, L., Volkmer, D.A., *J. Mass Spectrom.*, **39**, 1091 (2004).
- [172]Hunter, D.J.B., Brown, K.R., Pettigrew, G.W., *Biochem. J.*, **262**, 233 (1989).
- [173]Bertini, I., Cavalirro, G., Rosato, A., *Chem. Rev.*, **106**, 90 (2006).
- [174]Branca, R.M.M., Bodó G., Várkonyi Zs., Debreczeny M., Ősz J., Bagyinka Cs., *Arch. Biochem. Biophys.*, **467**, 174 (2007).
- [175]Tomčová, I., Branca, R.M.M., Bodó G., Bagyinka Cs., Smatanová, I.K., *Acta Crystallogr.*, **F62**, 820 (2006).
- [176]Samyn, B., Sergeant, K., Memmi, S., Debyser, G., Devreese, B., Van Beeumen, J., *Electrophoresis*, **27**, 2702 (2006).
- [177]Cohen, A.M., Mansour, A.A.H., Banoub, J.H., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 2454 (2006).
- [178]Scigelova, M., Maroto, F., Dufresne, C., Vasquez, J., http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_16502.pdf (2009. január 24.)
- [179]Frank, A.M., Savitski, M.M., Nielsen, M.L., Zubarev, R.A., Pevzner, P.A., *J. Proteome Res.*, **6**, 114 (2007).
- [180]Savitski, M.M., Nielsen, M.L., Kjeldsen, F., Zubarev, R.A., *J. Proteome Res.*, **4**, 2348 (2005).

- [181] Zubarev, R.A., Zubarev, A.R., Savitski, M.M., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **19**, 753 (2008).
- [182] Savitski, M.M., Nielsen, M.L., Zubarev, R.A., *Anal. Chem.*, **79**, 2296 (2007).
- [183] Boyne, M. T. II, Garcia, B.A., Li, M.X., Zamdborg, L., Wenger, C.D., Babai, S., Kelleher, N.L., *J. Proteome Res.*, **8**, 374 (2009).
- [184] Hajós F., *Brain Res.*, **93**, 485 (1975).
- [185] Kanner, B.I., Sharon, I., *Biochemistry*, **94**, 245 (1978).
- [186] Berridge, M. J., *Cell Calcium*, **32**, 235 (2002).
- [187] Paschen, W., *Cell Calcium*, **34**, 365 (2003).
- [188] Sitia, R., Braakman, I., *Nature*, **426**, 891 (2003).
- [189] Berridge, M. J., Lipp, P., Bootman, M. D., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **1**, 11 (2000).
- [190] Lücking, A., Cahill, D.J., *Proteomics in Drug Research* (Szerk.: Hamacher, M., Markus, K., Stühler, K., Van Hall, A., Warscheid, B, Meyer, H.E.), 7. fejezet, Wiley-VCH, 2006, 137.
- [191] Spisák S., Molnár B., Galamb O., Sipos F., Tulassay Zs., *Orvosi Hetilap*, **148**, 1511 (2007).
- [192] Cascio, M., Rapaka, R.S., *J. Peptide Protein Res.*, **60**, 307 (2002).
- [193] Malin, D.H., Lake, R.J., Hammond, M.V., Fowler, D.E., Rogillo, R.B., Brown, S.L., Sims, J.L., Leecraft, B.M., Yang, H.Y.T., *Peptides*, **11**, 969 (1990).
- [194] Inturrisi, C.E., *Clin. J. Pain*, **18**, S3 (2002).
- [195] Christie, M. J., *Br. J. Pharmacol.*, **154**, 384 (2008).
- [196] Doran, C.M., *Pharmacoeconomics*, **26**, 341 (2008).
- [197] Boyer, R.F., Interactive Concepts in Biochemistry,
http://www.wiley.com/legacy/college/boyer/0470003790/animations/membrane_transport/membrane_transport.htm (2009. február 3.)
- [198] Biser, P.S., Thayne, K.A., Kong, J.Q., Fleming, W.W., Taylor, D.A., *Brain Research*, **931**, 186 (2002).
- [199] Goodman, S.R., Zimmer, W.E., Clark, M.B., Zagon, I.S., Barker, J.E., Bloom, M.L., *Brain Res. Bull.*, **36**, 593 (1995).
- [200] Hu, S.X., Sheng, W.S., Lokensgard, J.R., Peterson, P.K., *Neuropharmacology*, **42**, 829 (2002).
- [201] Mao, J.R., Sung, B.K., Ji, R.R., Lim, G., *J. Neurosci.*, **22**, 7650 (2002).
- [202] Prókai L., Simpkins, J.W., *Pharmacol. Therapeut.*, **114**, 1 (2007).
- [203] Paradela, A., Albar, J.P., *J. Proteome Res.*, **7**, 1809 (2008).
- [204] Evans, G.J., Wilkinson, M.C., Graham, M.E., Turner, K.M., Chamberlain L.H., Burgoyne R.D., *J. Biol. Chem.*, **276**, 47877 (2001).

- [205] Stevens Jr., S.M., Chung, A.Y., Chow, M.C., McClung, S.H., Strachan, C.N., Harmon, A.C., Denslow, N.D., Prókai L., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 2157 (2005).
- [206] Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A., Van Remmen, H., *Free Rad. Biol. Med.*, **43**, 477 (2007).
- [207] Poon, H.F., Vaishnav, R.A., Getchell, T.V., Getchell, M.L., Butterfield, D.A., *Neurobiol. Aging*, **27**, 1010 (2006).
- [208] Van Remmen, H., Richardson, A., *Exp. Gerontol.*, **36**, 957 (2001).
- [209] Bruenner, B. A., Jones, A. D., German, J. B., *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 552 (1995).
- [210] Sims, N.R., Anderson, M.F., *Nature Protocols*, **3**, 1228 (2008).
- [211] Yan, L.-J., Levine, R.L., Sohal, R.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 11168 (1997).
- [212] Pedersen, W.A., Fu, W., Keller, J.N., Markesbery, W.R., Appel, S., Smith, R.G., Kasarskis, E., Mattson, M.P., *Ann. Neurol.*, **44**, 819 (1998).
- [213] Lauderback, C.M., Hackett, J.M., Huang, F.F., Keller, J.N., Szwed, L.I., Markesbery, W.R., Butterfield, D.A., *J. Neurochem.*, **78**, 413 (2001).
- [214] Trotti, D., Rolfs, A., Danbolt, N.C., Brown, R.H. Jr., Hediger, M.A., *Nature Neurosci.*, **2**, 427 (1999).
- [215] Temporini, C., Callerli, E., Massolini, G., Caccialanza, G., *Mass Spectrom. Rev.*, **27**, 207 (2008).
- [216] Stevens Jr., S.M., Prókai-Tátrai K., Prókai L., *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 2442 (2008).
- [217] Prókai, L., *Exp. Gerontol.*, közlésre elfogadva.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. Szintetikus oligomerek tömegspektrometriája atmoszférikus nyomáson történő ionizáció alkalmazásával	4
2.2. A neuropeptidek tömegspektrometriája	6
2.3. A ciklodextrin-komplexek elektroporlasztásos tömegspektrometriája . . .	8
2.4. Izolált fehérjék tömegspektrometriás azonosítása és <i>de novo</i> szekvenálása	9
2.5. A tömegspektrometrián alapuló proteomika, különös tekintettel a neuroproteomikára	11
3. Kísérleti módszerek	15
4. Jelentős eredményeim összefoglalása és értékelése	17
4.1. A GPC-API-MS és a GPC-API-MS/MS megvalósítása	17
4.2. A neuropeptidek és neuropeptid-metabolizmusok vizsgálata	25
4.3. A ciklodextrin-komplexek ESI tömegspektrometriája	32
4.4. Izolált fehérjék tömegspektrometriás azonosítása és <i>de novo</i> szekvenálása	36
4.5. Neuroproteomika	50
4.5.1. Agyból izolált szövetfrakciók fehérjekomponenseinek meghatározása	54
4.5.2. Kvantitatív neuroproteomika	61
4.5.3. A poszttranszlációs fehérje-karboniláció tömegspektrometriája	65
5. Összefoglalás	75
6. Hivatkozott szakirodalom	78

A dolgozat megírására feleségem, Tátrai Katalin, ösztönzött és nyújtott elkészítésében hathatós segítséget. Megköszönöm neki, hogy tudományos munkámban partnerként rá mindig számíthattam. A dolgozatban összefoglalt eredmények számos munkatársam közreműködésével születtek. Külön kiemelem Alevtina D. Zharikova, Stanley M. Stevens Jr., Ragulan Ramanathan, Rui Miguel Mamede Branca és Navin Rauniyar kitűnő munkáját, valamint az eredményes tudományos együttműködéseket William J. Simonsick Jr., John Roboz, William R. Kem, Bagyinka Csaba és Peter Koulen és kutatócsoportjaik részvételével. Kutatásaimat a National Institutes of Health (USA), a U.S. Army, a DuPont Marshall Research and Development Laboratory, a University of Florida Research Foundation, és a Robert A. Welch Foundation támogatta. Demeter Attilának köszönöm a kézirat alapos átolvasását és az észrevételeket. A dolgozat technikai megvalósításában Várkonyi Zsuzsanna volt segítségemre.

B4673